

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAMPTOTESİN İÇEREN POLİMERİK VE OLİGOSAKKARİT  
BAZLI NANOPARTİKÜLER FORMÜLASYONLARIN  
GELİŞTİRİLMESİ VE  
İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Ecz. Yasemin ÇIRPANLI**

**Farmasötik Teknoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2009**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAMPTOTESİN İÇEREN POLİMERİK VE OLİGOSAKKARİT  
BAZLI NANOPARTİKÜLER FORMÜLASYONLARIN  
GELİŞTİRİLMESİ VE  
İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Uzm. Ecz. Yasemin ÇIRPANLI**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**

**Ortak Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Erem BİLENSOY**

**Farmasötik Teknoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2009**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Teknoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Yılmaz Çapan  
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Sema Çalış  
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Nilüfer Tarıncı  
(Ankara Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Nevin Çelebi  
(Gazi Üniversitesi)

Ortak Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Erem Bilensoy  
(Hacettepe Üniversitesi)

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Ozer (V.)  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlükleri aşmamda bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bilimsel ve kişisel desteğini gördüğüm tez danışmanı saygıdeğer hocam Sayın **Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**'a, çalışmalarım sırasında bilimsel katkılarını benden esirgemeyen, her konuda yardımını ve desteğini gördüğüm ortak tez danışmanı hocam Sayın **Doç. Dr. Erem BİLENSOY**'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel çalışmalarını gerçekleştirebilmem için her türlü imkanı sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım saygıdeğer hocam Sayın **Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN**'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın in vivo kısımlarını tamamlamamda büyük desteklerini gördüğüm, bana laboratuvarlarını açan ve her türlü imkanı sağlayan Sayın **Prof. Dr. Jean-Pierre BENOIT**'a, Sayın **Doç. Dr. Catherine PASSIRANI**'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım kapsamında FT-IR çekimlerinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan hocam Sayın **Prof. Dr. Murat ŞEN**'e ve **Dr. Amir SEPEHRİANAZAR**'a, hücre kültürü çalışmaları süresince yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın **Doç. Dr. A. Lale DOĞAN**'a teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda ulaşabileceğimi bildiğim, dostluğu ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan **Uzm. Ecz. Burçin YAVUZ**'a yürekten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm **Uzm. Ecz. Tuğba GÜLSÜN**'e, **Bio. R. Eren AYATA**'ya, **Kim. Göksu YAĞ**'a teşekkür ederim.

Bütün hayatımın boyunca sevgi ve anlayışlarıyla her zaman yanımda olan ve bana her konuda destek olan **anneme, babama ve kardeşlerime** teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (No: 020230/005), TÜBİTAK Araştırma Projesi (HD-SBAG-66, 105S324), TÜBİTAK-BDP tarafından desteklenmiştir (Proje No: 0302301007).

## ÖZET

**Çırpanlı, Y. Kamptotesin içeren polimerik ve oligosakkarit bazlı nanopartiküler formülasyonların geliştirilmesi ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2009.** Kamptotesin (CPT) kuvvetli bir antikanser maddedir. Sudaki çözünürlüğünün az olması ve fizyolojik şartlarda stabil olmaması kamptotesinin klinik uygulamasını sınırlandırmıştır. Kamptotesinin çözünürlüğü ve fizyolojik pH'da stabilitesi amfifilik siklodekstrin, poli(laktid-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli-ε-kaprolakton (PCL) nanopartiküler sistemlerle düzeltilmeye çalışılmıştır. Nanopartiküller nanopresipitasyon tekniğine göre hazırlanmıştır. Bütün formülasyonların ortalama partikül büyüklükleri 275 nm'nin altında ve polidispersite indeksleri 0.2'den küçüktür. Amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerinin ilaç yükleme değerleri PLGA ve PCL nanopartiküllerine göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Nanopartikül formülasyonları kontrollü salım profili göstermiştir. Amfifilik siklodekstrin nanopartikülleri ile 12 güne kadar, polimerik nanopartiküllerle 48 saate kadar salım uzatılmıştır. Nanopartiküllerin antikanser etkinliği MCF-7 insan meme karsinoma hücreleri ile değerlendirilmiştir. Amfifilik siklodekstrin nanopartikülleri PLGA, PCL ve kamptotesinin DMSO'daki çözeltisine göre daha yüksek antikanser etkinlik göstermiştir. İn vivo çalışmalarda amfifilik siklodekstrin türevlerinden biri olan 6-0-Capro-βCD nanopartikülleri ile tedavi edilen grup beyin glioma modelinde kontrol grubuna ve diğer formülasyonlarla tedavi edilen gruplara göre sıçanlarda yaşam süresini önemli ölçüde artırmıştır. Bu sonuçlar göstermektedir ki, kamptotesin yüklü amfifilik siklodekstrin nanopartiküller polimerik taşıyıcılarla karşılaştırıldığında umut vaat edici taşıyıcı sistem olarak öne çıkmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kamptotesin, amfifilik siklodekstrin, poli(laktid-ko-glikolik asit), poli-ε-kaprolakton, nanopartikül, sıçan glioma modeli, antikanser etkinlik.

**Destekleyen Kurumlar:** Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (No: 020230/005), TÜBİTAK Araştırma Projesi (HD-SBAG-66, 105S324), TÜBİTAK-BDP.

## ABSTRACT

**Çirpanlı, Y. Formulation and in vitro/in vivo evaluation of camptothecin loaded polymeric and oligosaccharide based nanoparticulate drug delivery systems, Hacettepe University Health Sciences Institute, Pharmaceutical Technology Programme, Ph.D. Thesis, Ankara, 2009.** Camptothecin (CPT) is a potent anticancer agent. The clinical application of CPT is restricted by poor water solubility and instability under physiological conditions. Solubilization and stabilization of CPT were realized through nanoparticulate systems of amphiphilic cyclodextrins, poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL). Nanoparticles were prepared with nanoprecipitation technique. Mean particle sizes were under 275 nm and polydispersity indices were lower than 0.2 for all formulations. Drug loading values were significantly higher for amphiphilic cyclodextrin nanoparticles when compared to PLGA and PCL nanoparticles. Nanoparticle formulations showed a significant controlled release profile extended up to 12 days for amphiphilic cyclodextrin nanoparticles and 48 hours for polymeric nanoparticles. Anticancer efficacy of the nanoparticles was evaluated against MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles showed higher anticancer efficacy than PLGA or PCL nanoparticles and the CPT solution in DMSO. For in vivo evaluation, rat median survival was significantly improved for the group treated with 6-0-Capro- $\beta$ CD nanoparticles to the control group and the other formulations in brain glioma model. These results indicated that CPT-loaded amphiphilic cyclodextrin nanoparticles emerge as a promising carrier system when compared to polymeric carries.

**Key Words:** Camptothecin, amphiphilic cyclodextrin, poly(lactide-co-glycolide), poly- $\epsilon$ -caprolactone, nanoparticle, rat glioma model, anticancer efficacy.

**Supporting Institutes:** Hacettepe University Scientific Research Fund Project (No: 020230/005), TÜBİTAK Research Project (HD-SBAG-66, 105S324), TÜBİTAK-BDP.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	iii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iv
<b>ÖZET</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xiii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xv
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xix
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Nanopartiküller	4
2.1.1. Tanımı ve Genel Özellikleri	4
2.1.2. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	7
2.1.2.1 Poli(laktid-ko-glikolik asit) (PLGA)	9
2.1.2.2 Poli-ε-Kaprolakton (PCL)	10
2.1.3. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	11
2.1.3.1 Nanopresipitasyon (Küresel Kristalizasyon) Metodu	11
2.1.4. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları	13
2.1.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri	14
2.1.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	14
2.1.5.2. Zeta Potansiyel	15
2.1.5.3. Yüzey Özellikleri	15
2.1.5.4. İlaç Yükleme Kapasitesi	15
2.1.5.5. İn Vitro Etkin Madde Salımı	16
2.2. Siklodekstrinler	17
2.2.1. Siklodekstrin İçeren Nanopartiküller	23
2.2.2. Siklodekstrin Türevleri	25
2.2.3. Amfifilik Siklodekstrinler	27
2.2.4. İlaç:Siklodekstrin Komplekslerinin Karakterizasyonu	29

2.2.5.	Siklodekstrinlerin İlaç Taşınmasında Kullanılması	31
2.3.	Kanser	32
2.3.1.	Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Nanopartiküller	33
2.3.2.	Beyin Tümörü ve Stereotaksi Yöntemi İle Tedavi Uygulaması	36
2.4.	Hücre Kültürü Çalışmaları	39
2.4.1.	Tanımı ve Kullanım Alanları	39
2.4.2.	Hücre Yaşayabilirliğinin Ölçülmesi	40
2.5.	Kamptotesin	41
2.5.1.	Miktar Tayini	42
2.5.2.	Stabilitesi	42
2.5.3.	Farmakolojik Özellikleri	43
2.5.4.	Kamptotesinin Etki Mekanizması	45
2.5.5.	Kamptotesin İçin Alternatif Formülasyon Yaklaşımları	46
2.5.6.	Kamptotesin Türevleri	47
2.5.6.1.	İrinotekan (CPT-11)	47
2.5.6.2.	Topotekan	47
2.5.6.3.	9-Amino Kamptotesin (9-AC)	47
2.5.6.4.	9-Nitro Kamptotesin (9-NC)	48
2.5.7.	Ticari Preparatları	48
2.5.7.1.	Camptosar <sup>®</sup>	48
2.5.7.2.	Hycamtin <sup>®</sup>	48
2.5.8.	Kamptotesin Sübstitüsyonları	49
<b>3.</b>	<b>DENEYSEL</b>	<b>50</b>
3.1.	Araçlar ve Gereçler	50
3.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.1.2.	Kullanılan Aletler	52
3.1.3.	Kamptotesinin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	54
3.1.3.1.	Ultraviyole (UV) Spektrumu	54
3.1.3.2.	Diferensiyal Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi	54
3.1.3.3.	Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu	54
3.1.3.4.	<sup>1</sup> H-NMR Spektroskopisi	54
3.1.3.5.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	54

3.1.4.	Kamptotesinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Miktar Tayini	55
3.1.4.1.	Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi	55
3.1.4.2.	Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu	56
3.1.4.2.1.	Doğrusallık	56
3.1.4.2.2.	Keskinlik	56
3.1.4.2.3.	Duyarlılık	57
3.1.4.2.4.	Özgünlük	57
3.1.4.2.5.	Stabilite	57
3.1.5.	Kamptotesinin Hidroliz Kinetiğinin Belirlenmesi	58
3.1.6.	Faz Çözünürlük Çalışmaları	58
3.1.7.	Kamptotesin:Doğal Siklodekstrin ve Kamptotesin:Amfifilik $\beta$ -Siklodekstrin İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması	58
3.1.7.1.	Kamptotesin:Doğal Siklodekstrin İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması	58
3.1.7.2.	Kamptotesin:Amfifilik $\beta$ -Siklodekstrin İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması	59
3.1.8.	Hazırlanan Komplekslerin Karakterizasyonu	59
3.1.8.1.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi	59
3.1.8.2.	Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu	59
3.1.8.3.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	59
3.1.8.4.	$^1\text{H-NMR}$ Spektroskopisi	60
3.1.9.	Kamptotesin Yüklü Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Hazırlanması	60
3.1.9.1.	Amfifilik $\beta$ -Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Hazırlanması	60
3.1.9.2.	Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması	62
3.1.9.2.1.	PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması	62
3.1.9.2.2.	PCL Nanopartiküllerinin Hazırlanması	62
3.1.9.3.	Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	64
3.1.9.3.1.	Partikül Büyüklüğü Dağılımı	64
3.1.9.3.2.	Zeta Potansiyel Ölçümü	64
3.1.9.3.3.	Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	64

3.1.9.4.	İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	65
3.1.9.5.	Nanopartiküllerden Kamptotesinin İn Vitro Salımı	65
3.1.9.6.	L-929 Fare Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksosite Testi	66
3.1.9.7.	İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Etkinlik Testi	67
3.1.9.8.	Sıçanlarda Beyin Glioma Modeli	68
3.1.9.8.1.	Kullanılan Hayvanlar ve Anestezi	68
3.1.9.8.2.	Hücre Kültürü ve Tümör Hücresinin İmplantasyonu (Tümör Oluşturma Yöntemi)	68
3.1.9.8.3.	Magnetik Rezonans Görüntüleme	70
3.1.9.8.4.	Sıçanlarda Oluşturulan Beyin Tümörünün Nanopartikül Süspansiyonu ile Tedavisi	70
3.1.9.8.5.	Beyin Tümörü Oluşturulan Sıçanların Gözlemi	71
3.1.9.8.6.	İstatistiksel Analiz	71
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>72</b>
4.1.	Kamptotesinin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulgular	72
4.1.1.	Ultraviyole (UV) Spektrumu	72
4.1.2.	Diferensiyal Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi	73
4.1.3.	Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu	75
4.1.4.	<sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	75
4.1.5.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	78
4.1.6.	Kamptotesinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Miktar Tayinine İlişkin Bulgular	78
4.1.7.	Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonuna İlişkin Bulgular	80
4.1.7.1.	Doğrusallık	80
4.1.7.2.	Kesinlik	81
4.1.7.2.1.	Tekrar Edilebilirlik	81
4.1.7.2.2.	Tekrar Elde Edilebilirlik	83
4.1.7.3.	Duyarlılık	84
4.1.7.4.	Özgünlük	84
4.1.7.5.	Stabilite	85
4.1.8.	Kamptotesinin Hidroliz Kinetiğinin Belirlenmesi	86

4.1.9.	Faz Çözünürlük Çalışmaları	88
4.2.	Hazırlanan İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu	90
4.2.1.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi	90
4.2.2.	Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu	94
4.2.3.	<sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	96
4.2.4.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	104
4.3.	Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	106
4.3.1.	Partikül Büyüklüğü Tayini	106
4.3.2.	Zeta Potansiyel Ölçümü	107
4.3.3.	Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	108
4.3.3.1.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	108
4.3.3.2.	Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Analizi	109
4.3.3.3.	İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	112
4.3.3.4.	Nanopartiküllerden Kamptotesinin İn Vitro Salımı	113
4.3.3.5.	L-929 Fare Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksisite Testi	114
4.3.3.6.	MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Karşı Antikanser Etkinlik	115
4.3.4.	Sıçanlarda Beyin Glioma Modeli	116
4.3.4.1.	Magnetik Rezonans Görüntüleme	116
4.3.4.2.	Oluşturulan Tümörlerin Kamptotesin İçeren Nanopartikül Süspansiyonu ile Tedavisi	117
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	119
5.1.	Kamptotesinin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	120
5.2.	Kamptotesinin Hidroliz Kinetiğinin Belirlenmesi	122
5.3.	Faz Çözünürlük Çalışmaları	122
5.4.	Hazırlanan Komplekslerin Karakterizasyonu	123
5.5.	Nanopartiküllerinin Hazırlanması	126
5.6.	Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	129
5.6.1.	Partikül Büyüklüğü Dağılımı	129
5.6.2.	Zeta Potansiyel Ölçümü	131
5.6.3.	Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	133
5.6.3.1.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve Atomik Güç Mikroskop (AFM) Analizi	133

5.6.4.	İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	133
5.6.5.	Nanopartiküllerden Kamptotesin'in İn Vitro Salımı	135
5.6.6.	L-929 Fare Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksisite Testi	137
5.6.7.	İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Etkinlik Testi	138
5.6.8.	Oluşturulan Tümörün Nanopartikül Süspansiyonu ile Tedavisi	139
6.	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	141
	<b>KAYNAKLAR</b>	143
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	166
	<b>EKLER</b>	172

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CPT	Kamptotesin
CPT-11	İrinotekan
9-AC	9-Amino kamptotesin
9-NC	9-Nitro kamptotesin
PLGA	Poli(laktid-ko-glikolik asit)
PCL	Poli-ε-kaprolakton
HP-β-CD	Hidroksipropil β-siklodekstrin
β-CD	β-Siklodekstrin
γ-CD	γ-Siklodekstrin
RM-β-CD	Rastgele metillenmiş β-siklodekstrin
SBE-β-CD	Sülfobütiler β-siklodekstrin
MTT	[3(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
MTS	[3(4,5-dimetiltiyazol-2il)-5-(3-karboksimetoksifenil)2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum,tuzu]
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential scanning calorimetry)
FDA	Amerikan ilaç ve gıda dairesi (Food and drug admisintration)
EMA	Avrupa ilaç ajansı (European medicines agency)
FT-IR	Fourier dönüşümü kızıl ötesi (Fourier transform infrared)
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)
SEM	Taramalı elektron mikroskopu (Scanning electron microscope)
AFM	Atomik kuvvet mikroskopu (Atomic force microscope)
TEM	Transmisyon elektron mikroskopu (Transmission electron microscopy)
STM	Taramalı tünel mikroskopu (Scanning tunneling microscopy)
UV	Mor ötesi (Ultraviolet)
TGA	Termogravimetrik analiz
NMR	Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi
EPR	Artan geçirgenlik ve tutulma etkisi (Enhanced permeation and retention)

RES	Retikuloendotelyal sistem
NIH	Amerikan ulusal sağlık enstitüsü (US national institutes of health)
$M_A$	Molekül ağırlığı
VK	Varyasyon katsayısı
X	Ortalama
SS	Standart sapma

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil</b>		<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1.	Nanoküre yapısının şematik gösterimi	5
Şekil 2.2.	Nanokapsül yapısının şematik gösterimi	6
Şekil 2.3.	Nanopresipitasyon metoduna göre nanopartikül hazırlanmasının şematik gösterimi (A: Laboratuvar koşullarında, B: Büyük ölçekte hazırlama)	12
Şekil 2.4.	Siklodekstrinlerin genel yapısı	17
Şekil 2.5.	Farklı molar oranlarda ilaç:siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin şematik gösterimi	21
Şekil 2.6.	Teorik faz çözünürlük diyagram tipleri	22
Şekil 2.7.	Siklodekstrinlerin modifikasyonunun şematik gösterimi (A: Sekonder yüzün modifikasyonu, B: Primer yüzün modifikasyonu)	28
Şekil 2.8.	Siklodekstrinlerin primer ve sekonder yüzlerindeki modifikasyon bölgeleri	28
Şekil 2.9.	Siklodekstrinlerde yapılabilecek modifikasyonların şematik gösterimi	29
Şekil 2.10.	Kanser oluşumunun şematik olarak gösterilmesi	33
Şekil 2.11.	Dolaşımda uzun süre kalabilen nanopartiküllerin, permeabilitesi artmış damar endotelinden geçerek tümör interstisyumuna ulaşmasının şematik gösterimi	36
Şekil 2.12.	Stereotaksi yöntemi ile beyin tümörlerinin tedavi edilmesinin şematik gösterilmesi	38
Şekil 2.13.	Stereotaksi yönteminin şematik gösterimi (A: Hedef bölgenin spesifik koordinatlarla belirlenmesi ve kateterin yerleştirilmesi, B: Difüzyon, C: Konveksiyon)	39
Şekil 2.14.	Kamptotesinin açık formülü	42
Şekil 2.15.	Kamptotesinin lakton ve karboksilat formlarının şematik gösterimi	43
Şekil 2.16.	Hücre siklusunun şematik gösterimi	44

Şekil 2.17.	Kamptotesinin etki mekanizması	46
Şekil 2.18.	Kamptotesinin yapı aktivite ilişkisi	49
Şekil 3.1.	Amfifilik $\beta$ -siklodekstrin nanopartiküllerinin nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanması	61
Şekil 3.2.	Polimerik nanopartiküllerin nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanması	63
Şekil 3.3.	Stereotaksi aletine yerleştirilen sıçanlar	69
Şekil 3.4.	Stereotaksi aletine yerleştirilen sıçanların nanopartikül süspansiyonu ile tedavi edilmesi	71
Şekil 4.1.	Kamptotesinin 200-400 nm dalga boyu arasında çekilen UV spektrumu	72
Şekil 4.2.	Kamptotesine ilişkin DSC termogramı	74
Şekil 4.3.	Kamptotesinin FT-IR spektrumu	76
Şekil 4.4.	Kamptotesinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	77
Şekil 4.5.	Kamptotesine ilişkin SEM fotoğrafı (X 2000)	78
Şekil 4.6.	Kamptotesinin aktif lakton formuna ilişkin HPLC piki ( $R_t=13.8$ dk)	79
Şekil 4.7.	Kamptotesinin inaktif karboksilat formuna ilişkin HPLC piki ( $R_t=4$ dk)	79
Şekil 4.8.	Kamptotesinin aktif lakton formunun kalibrasyon doğrusu ve denklemi ( $n=6$ )	80
Şekil 4.9.	Kamptotesinin inaktif karboksilat formunun kalibrasyon doğrusu ve denklemi ( $n=6$ )	81
Şekil 4.10.	Kamptotesinin lakton formunun pH 7.4'te zamana karşı % miktarı ( $n=3\pm\text{SS}$ )	86
Şekil 4.11.	Kamptotesinin lakton formuna ilişkin hidroliz kinetiği profili ( $n=3\pm\text{SS}$ )	87
Şekil 4.12.	Kamptotesinin karboksilat formunun pH 7.4'te zamana karşı % miktarı ( $n=3\pm\text{SS}$ )	87
Şekil 4.13.	Kamptotesinin karboksilat formuna ilişkin hidroliz kinetiği profili ( $n=3\pm\text{SS}$ )	88
Şekil 4.14.	$\beta$ -CD'e ilişkin faz çözünürlük diyagramı ( $n=3\pm\text{SS}$ )	89

Şekil 4.15.	HP- $\beta$ -CD'e ilişkin faz çözünürlük diyagramı (n=3 $\pm$ SS)	89
Şekil 4.16.	Kamptotesine, 6-O-Capro- $\beta$ -CD'e, CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ve CPT/6-O-Capro- $\beta$ -CD fiziksel karışımına ilişkin DSC termogramları	91
Şekil 4.17.	Kamptotesine, $\beta$ -CDC6'ya, CPT: $\beta$ -CDC6 inklüzyon kompleksine ve CPT/ $\beta$ -CDC6 fiziksel karışımına ilişkin DSC termogramları	92
Şekil 4.18.	Kamptotesine, HP- $\beta$ -CD'e, CPT:HP- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ve CPT/HP- $\beta$ -CD fiziksel karışımına ilişkin DSC termogramları	93
Şekil 4.19.	Kamptotesine, 6-O-Capro- $\beta$ -CD'e ve hazırlanan CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ilişkin FT-IR spektrumları	95
Şekil 4.20.	Kamptotesine, $\beta$ -CDC6'ya ve hazırlanan CPT: $\beta$ -CDC6 inklüzyon kompleksine ilişkin FT-IR spektrumları	95
Şekil 4.21.	Kamptotesine, HP- $\beta$ -CD'e ve hazırlanan CPT:HP- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ilişkin FT-IR spektrumları	96
Şekil 4.22.	6-O-Capro- $\beta$ -CD'e ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	98
Şekil 4.23.	$\beta$ -CDC6'e ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	99
Şekil 4.24.	HP- $\beta$ -CD'e ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	100
Şekil 4.25.	CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	101
Şekil 4.26.	CPT: $\beta$ -CDC6 inklüzyon kompleksine ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	102
Şekil 4.27.	CPT:HP- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ilişkin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	103
Şekil 4.28.	Kamptotesine, siklodekstrinlere ve hazırlanan inklüzyon komplekslerine ilişkin SEM fotoğrafları (A: $\beta$ -CDC6, B: CPT: $\beta$ -CDC6, C: 6-O-Capro- $\beta$ -CD, D: CPT:6-O-Capro- $\beta$ CD, E:HP- $\beta$ -CD, F: CPT:HP- $\beta$ -CD, G: CPT)	105
Şekil 4.29.	Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları (A: 6-O-Capro- $\beta$ CD, B: $\beta$ -CDC6, C: PLGA, D:	109

	PCL nanopartikülleri)	
Şekil 4.30.	Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin AFM fotoğrafları (A: 6-O-Capro- $\beta$ CD, B: $\beta$ -CDC6, C: PCL, D: PLGA nanopartikülleri)	111
Şekil 4.31.	Kamptotesin yüklü nanopartikül formülasyonlarına ilişkin in vitro salım grafikleri (n=3 $\pm$ SS)	114
Şekil 4.32.	Kamptotesin içermeyen nanopartikül formülasyonlarının ve kamptotesinin dimetilsülfoksitteki çözeltisinin 1/128 dilüsyonuna karşı gözlenen % L-929 fare fibroblast hücre yaşayabilirliği (1/128 dilüsyon) (n=3 $\pm$ SS)	115
Şekil 4.33.	Nanopartikül formülasyonlarının ve kamptotesinin dimetilsülfoksitteki çözeltisinin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (1/128 dilüsyon) (n=3 $\pm$ SS) (CPT: Kamptotesin, NP: Nanopartikül)	116
Şekil 4.34.	Sıçanlarda 9L hücreleri ile oluşturulan tümörlerin nükleer magnetik rezonans görüntüleme aleti ile gösterilmesi	117
Şekil 4.35.	Nanopartikül süspansiyonu ile tedavi edilen sıçan gruplarının yaşam süresi	118

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1.	Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerik bileşenler	8
Tablo 2.2.	Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özelliklerine ve farmakope monograflarına ilişkin bilgiler	18
Tablo 2.3.	Siklodekstrin içeren ruhsatlandırılmış farmasötik ürünler	23
Tablo 2.4.	Doğal siklodekstrinlerden $\alpha$ -CD, $\beta$ -CD, $\gamma$ -CD'in özellikleri	26
Tablo 3.1.	Kamptotesinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar	55
Tablo 4.1.	Kamptotesinin lakton formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar edilebilirlik sonuçları	82
Tablo 4.2.	Kamptotesinin karboksilat formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar edilebilirlik sonuçları	82
Tablo 4.3.	Kamptotesinin lakton formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar elde edilebilirlik sonuçları	83
Tablo 4.4.	Kamptotesinin karboksilat formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar elde edilebilirlik sonuçları	84
Tablo 4.5.	Kamptotesinin lakton formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında stabilite çalışmaları sonuçları	85
Tablo 4.6.	Kamptotesinin karboksilat formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında stabilite çalışmaları sonuçları	85
Tablo 4.7.	6-O-Capro- $\beta$ CD, $\beta$ -CDC6 ve HP- $\beta$ -CD'e ilişkin protonların kamptotesin ile kompleksleşmeden önceki ( $\delta_{CD}$ ) ve sonraki ( $\delta_{1:1}$ ) kimyasal kayma değerleri	97
Tablo 4.8.	Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PI) ve zeta potansiyeli değerleri	107
Tablo 4.9.	Nanopartiküllere ilişkin ilaç yükleme kapasitesi değerleri	112

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser tedavisinde, klinik deneme aşamasına gelmiş ve FDA tarafından onaylanmış olan ya da araştırma-geliştirme safhasında bulunan pek çok antikanser ilaç ciddi yan etkiler ve kemoterapide sorunlar oluşturabilmektedir. Bunlar, kısaca aşağıdaki gibi özetlenebilir:

a) Antikanser ilaçların çoğunun suda çözünürlük sorunu vardır. Bu sebeple, kemoterapide klinik tercih olan intravenöz uygulama için yardımcı çözücülerle formüle edilmek zorundadırlar. Bu durumda da yardımcı çözücülerin (Cremophor EL gibi) yol açtığı şiddetli hassasiyet reaksiyonları ve yan etkiler hasta uyuncunu ve dolayısıyla da kemoterapinin etkinliğini büyük ölçüde azaltmaktadır.

b) Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların çoğu terapötik aralıklarının dar olması ve olası çözünürlük problemlerine bağlı olarak farmakokinetik değişkenlik ve bireylerarası farklılıklar göstermektedir. Her bireyde elde edilen kan profillerinin farklı olması, uygulanan dozun normalize edilmesini gerektirmektedir. Bunların yanısıra, kemoterapinin aralıklı kürler halinde yapılması ve tedavi döneminde kanda yükselen ilaç seviyesinin, bekleme dönemlerinde tekrar düşerek tümör hücrelerinin gelişmesine olanak sağlaması da söz konusudur.

c) Antikanser ilaçların geniş bir dağılma hacmi vardır ve vücutta tümör hücrelerinin yanısıra normal hücreleri de etkileyerek sağlıklı hücrelere karşı sitotoksik etki gösterirler.

Nanopartiküller, kan dolaşımından, damar ağı açısından zengin olan tümör dokularına büyük oranda sızabilmekte ve daha az ilaçla hedef dokulara ulaşarak düşük toksisite/yüksek etki amacına ulaşılabilmesine olanak sağlamaktadırlar. Polimerler ve oligosakkaritler nanopartikül hazırlanmasında sıklıkla kullanılabilmekte olup, her birinin sağladığı yükleme etkinliği, in vitro salım özellikleri, oluşturduğu toksisite ve antikanser etkinliği farklı olabilmektedir.

Kanser tedavisinde, ilacın fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanan sorunlar nedeniyle kemoterapiden yeterince fayda sağlanamaması sık rastlanan bir durumdur. Buna örnek bir molekül olarak, kamptotesin verilebilir. Kamptotesin

kolon, meme, yumurtalık, akciğer kanseri gibi geniş kanser spektrumunda etkin olan, oldukça güçlü bir antikanser maddedir. Ancak, kamptotesin suda çözünmeyen ve pH'ya bağlı stabilite sorunu olan bir antikanser maddedir. pH'ya bağımlı olarak iki formda bulunmaktadır. pH 5'in altında aktif lakton formunda iken; bazik veya fizyolojik nötral pH'da inaktif karboksilat formundadır. Kamptotesinin aktif olmayan karboksilat formu aynı zamanda yan etkilere de yol açmakta ve kemoterapötik etkinliğin kaybına/zayıflamasına neden olmaktadır. Bu durum, kamptotesinin etkin kullanımını için farklı bir formülasyon yaklaşımını gerektirmektedir. İn vitro koşullarda antitümör aktivitesinin saptanmasına rağmen, yukarıda sözü edilen fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanan sorunlardan ötürü, bugüne kadar henüz in vivo kullanımına geçilememiştir.

Bu gerekçeler nedeniyle, tez kapsamında, formülasyon geliştirme çalışmalarının ilk aşamasında, kamptotesinin stabilizasyonu amfifilik ve doğal siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksleri hazırlanarak sağlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, kanser tedavisinde, siklodekstrin bazlı nanopartiküler sistemler kullanılarak, kamptotesin gibi etkinliği yüksek bir antikanser molekülün daha düşük dozda hedef bölgede birikerek yan etkilerinin azaltılması ve hasta uyuncunun artırılması amacıyla amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin, poli(laktid-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli- $\epsilon$ -kaprolakton (PCL) nanopartikülleri hazırlanmış ve hazırlanan nanopartiküller beyine intrakranial olarak implante edilmiştir. Formülasyonların hazırlanmasında, inklüzyon kompleksinin kapasitesini artırmaya uygun türevler olmaları nedeniyle, primer yüzü modifiye edilmiş amfifilik bir  $\beta$ -siklodekstrin olan 6-O-Capro- $\beta$ CD ile sekonder yüzü modifiye edilmiş amfifilik bir  $\beta$ -siklodekstrin olan  $\beta$ -CDC6 üzerinde çalışılmıştır.

Kamptotesin:siklodekstrin kompleksi iki farklı yöntemle nanopartiküler sistem haline getirilmiştir:

- Kamptotesin:amfifilik siklodekstrin inklüzyon kompleksinden nanopresipitasyon yöntemi ile direkt olarak nanopartikül elde edilmesi,
- Kamptotesin:doğal siklodekstrin inklüzyon kompleksinin polimerik (PLGA veya PCL) nanopartiküllere hazırlama sırasında enkapsülasyonu.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, amfifilik siklodekstrinler ve PLGA, PCL polimerleriyle hazırlanan nanopartikül formülasyonları; partikül büyüklüğü ölçümleri, zeta potansiyel analizleri, enkapsülasyon etkinliklerinin hesaplanması, in vitro salım özelliklerinin tayini gibi in vitro yöntemler kullanılarak karakterize edilmelerini takiben, boş nanopartiküllerin hücre kültürü ile sitotoksitesinin değerlendirilmesi, kamptotesin yüklü nanopartiküllerin antikanser etkinliğinin hücre kültürü çalışmaları ile araştırmaları gerçekleştirilmiş ve sıçanlarda beyin glioma modeli ile etkinliğin in vivo şartlarda değerlendirilmesine ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Tüm deneysel çalışmalar istatistiksel karşılaştırmalı olarak yapılmış olup, formülasyonları gerçekleştirilen amfifilik siklodekstrin, PLGA ve PCL nanopartikülleri arasındaki en etkin ve güvenli formülasyonun tespitine çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nanopartiküller

#### 2.1.1. Tanımı ve Genel Özellikleri

Nanopartiküller, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerler ile hazırlanan, kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. İlk olarak, 1970'lerde bölgeye özgü ilaç taşınması amacıyla kullanılmıştır. Düşük molekül ağırlıklı ilaçları ve peptit-protein gibi makromolekülleri lokalize veya sistemik olarak taşıyabilirler. Etkin madde, nanopartiküllerde; çözünmüş, enkapsüle edilmiş ve/veya adsorbe halde bulunabilir (1,2).

Nanopartiküller pek çok üstünlüğü ile diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerden farklılık göstermektedirler. İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin üstünlükleri şöyle sıralanabilir (2-6):

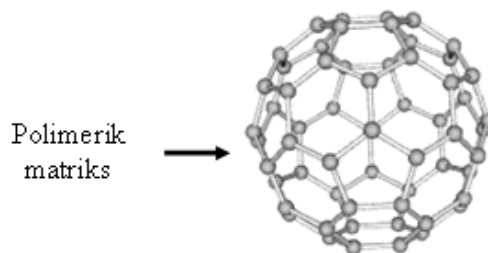
- Nanopartiküllerin, partikül büyüklüklerinde ve yüzey özelliklerinde değişiklikler yapılabileceği için parenteral uygulama sonrası, pasif ve aktif ilaç hedeflendirilmesi mümkün olabilmekte, bu şekilde, nanopartiküllerin retiküloendotelial sistem (RES) makrofajları tarafından tanınması da engellenebilmektedir.
- Polimerik yapıları ile etkin maddenin hedeflendirilebilmesinin yanısıra, salımının kontrolü ve sürdürülmesi de sağlanabilmektedir. Hedeflenen bölgede, injeksiyonlarını takiben, günler hatta haftalar süren etkin madde salımına olanak sağlayabilmektedirler.
- Nanopartiküller, diğer kolloidal taşıyıcı sistemlere (örneğin lipozomlar) kıyasla biyolojik ortamda daha yüksek stabiliteye sahiptirler.
- Nanopartiküller, farklı yöntemlerle sterilize edilebilmektedirler.
- Biyolojik parçalanabilen polimerlerle hazırlandıklarında, fizyolojik ortamda parçalanabilirler ve parçalanma ürünleri toksik değildir.
- Küçük partikül boyutları nanopartiküllerin kapillerlere penetrasyonuna olanak sağlamak ve hücreler tarafından tutulmalarını kolaylaştırmaktadır.

Bu şekilde, vücutta hedeflenen bölgede etkin madde salımı gerçekleştirilebilmektedir.

- Etkin maddenin hedef bölgede salımı sağlandığı için, ilacın diğer organlar ve dokular üzerindeki sistemik toksisitesi büyük ölçüde azaltılmış olur.
- Etkin maddenin vücuttaki dağılımını ve terapötik etkinliğini düzenlemek mümkündür.
- Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır.

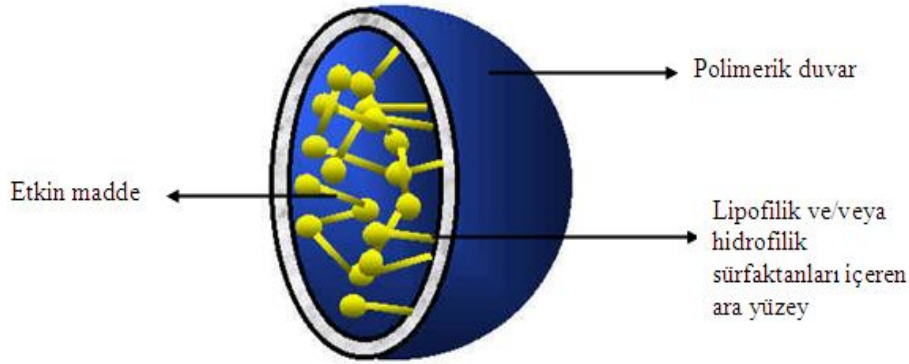
Bu üstünlüklerinin yanı sıra, nanopartiküllerin bazı sakıncaları da bulunmaktadır. Bu sistemlerin, sahip oldukları oldukça küçük partikül büyüklüğü ve geniş yüzey alanı partiküller arası agregasyona neden olabilmekte, bu da nanopartiküllerin katı veya sıvı formları halinde saklanmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca, küçük partikül büyüklüğü ile geniş yüzey alanı, sınırlı ilaç yüklemesine ve salımda ani patlama etkisine yol açabilir ki, bu etki “*burst effect*” yani “*patlama etkisi*” olarak bilinmektedir. Nanopartiküller, klinik olarak kullanıma geçmeden yani ruhsatlandırılmadan önce bu sorunların çözüme kavuşturulması gerekmektedir (7, 8).

Nanopartikülleri kısaca tanımlamak gerekirse, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül adını almaktadırlar. Nanoküreler, ilacın partikül içinde disperse olduğu ve/veya yüzeye adsorbe veya konjüge edildiği matriks sistemlerdir. Bunlarda, Şekil 2.1’de görüldüğü üzere, partikülü çevreleyen devamlı ve sınırlayıcı bir zarf yapısı yoktur, yoğun bir polimerik ağ yapısından oluşmaktadırlar. Nanoküre hazırlamada genellikle doğal ya da sentetik polimerler kullanılmaktadır. Nanokürelerden ilaç salımının; yüzeye bağlı adsorbe olan ilacın desorpsiyonu, nanoküre matriksinden difüzyonu, nanoküre matriks erozyonu, kombine erozyon/difüzyon olayı gibi mekanizmalar ile gerçekleştiği bilinmektedir (2).



Şekil 2.1. Nanoküre yapısının şematik gösterimi

Nanokapsüller ise, yağlı bir iç çekirdek, onu çevreleyen polimerik duvar ve ara yüzeyde sürfaktanlardan oluşmaktadır (Şekil 2.2). Yağlı çekirdeği çevreleyen polimerik duvar, yapıyı dayanıklı kılmaktadır. Bunlar, membran tipi sistemlerdir. İçteki yağ rezervuarı, lipofilik ilaçların yüksek miktarlarda enkapsüle edilmesine olanak vermektedir (9-11).



Şekil 2.2. Nanokapsül yapısının şematik gösterimi

Partikül büyüklüğü dağılımı, nanopartiküler sistemlerin en önemli ve belirleyici özelliklerinden birisidir. Zira, partikül büyüklüğü; sistemin in vivo dağılımı, biyolojik akibeti, toksisitesi ve hedeflendirilmesi hakkında ön fikir vermekte, ayrıca ilaç yüklemesini ve salımını değiştirebilmekte, hatta nanopartikül stabilitesi üzerinde de etkili olabilmektedir. Nanopartiküller, nanometre boyutundaki yapılarından dolayı mikropartiküler sistemlere kıyasla hücre içine daha fazla alınmaktadır. Desai ve diğ. (12) yaptıkları çalışmalarında, 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin 1  $\mu\text{m}$  boyutundaki mikropartiküllere oranla ikibuçuk kat daha fazla hücre içine alındığını ve 10  $\mu\text{m}$  boyutundaki mikropartiküllere kıyasla Caco-2 hücrelerinden altı kat daha fazla alındığını göstermişlerdir.

Partikül büyüklüğünün, ilaç salımını da etkilediği bilinmektedir. Küçük partiküller büyük yüzey alanına sahip oldukları için bu özellikleri hızlı salıma yol açmaktadır (2). Partikül büyüklüğünden başka, yüzey özellikleri de, partiküllerin alınmasında, dağılmasında ve etkinliğinde önemli bir parametre olarak bilinmektedir (13).

Bu özelliklerinden dolayı, son yıllarda, nanoteknoloji alanında nanopartiküler sistemlerle ilgili araştırmalara ve uygulamalara ilişkin çalışmaların sayısında önemli ölçüde artış olmuştur (14-17). Özellikle, nanoteknolojinin tıp alanındaki uygulamalarının, hastalıkların teşhisi ve tedavisinde çok önemli katkıların olacağı düşünülmektedir. Tıptaki uygulamalar özellikle; ilaç taşınması, in vitro/in vivo diagnostiklerin uygulanması, diyet destekleyiciler, geliştirilmiş biyogeçimli materyallerin üretimi gibi konuları kapsamaktadır ve nanopartiküller, bu uygulamaların gerçekleştirilmesini sağlayabilecek önemli araçlar olarak gündemdedir (18-21).

Nanotıp alanında nanoteknolojinin potansiyelini kullanabilmek için nanopartiküllerin güvenilirlik ve toksikolojik özelliklerin dikkatle incelenmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir. Konuya ilişkin olarak yapılan bir çalışmada (22), nanopartikül toksisitesine ilişkin 4 olası mekanizma ortaya koyulmuştur. Bunlar:

1. Kimyasal toksisite,
2. Parçalanma ürünlerine ilişkin toksisite,
3. Nanopartiküllerin endositozuna ilişkin toksisite,
4. Membran dağılması/çözünmesi (kimyasal toksisite) sonucu toksisitedir.

Nanoteknolojide en önemli hedefler; spesifik ilaç taşınması ve hedefleme, terapötik etki sağlanırken toksisitenin azaltılması, daha fazla güvenlik ve biyogeçimlilik, yeni güvenli ilaçların daha hızlı geliştirilmesidir (23).

### **2.1.2. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler**

Nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır (Tablo 2.1). İlk nanopartikül formülasyonları, albumin gibi doğal ve poli (akrilamid), poli (metil metakrilat) gibi biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerler ile hazırlanmıştır. Protein bazlı polimerlere karşı antijenik yanıtlar gelişebilirken, biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerin en önemli sakıncaları toksisite riskleridir. Hazırlama sırasında sentezlenen polimerlerde ise, toksik özellikte olan monomerlerin nanopartikül yapısında artık olarak kalabilme

sakıncası bulunmaktadır. Son zamanlarda peptit, protein ve nükleik asitlerin nanopartiküller ile taşınmasında polisakkaritlerden de yararlanılmaktadır (25).

Nanopartiküllerin hazırlanmasında, gerekli durumlarda yüzey modifikasyonu da önemli bir seçenek olarak bulunmaktadır. Polietilen glikol (PEG) ile yüzey modifikasyonu mononükleer fagositik sistem tarafından tanınmayı inhibe ettiği için bu şekilde, nanopartiküllerin kan dolaşımında uzun süre kalması sağlanabilmektedir. Nanopartiküllerin kaplanması, aglomerasyonun önlenmesi açısından önem taşımaktadır, zira bu şekilde partiküller koloidal süspansiyon şeklinde kalabilmektedirler. Yapılan çalışmalarda, kaplama amacıyla PEG, PVP, dekstran, kitosan gibi polimerler ve sodyum oleat, dodesilamin gibi sürfaktanların sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (26-31).

Tablo 2.1. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerik bileşenler (2)

Polimer tipleri	Polimer örnekleri
Sentetik polimerler	Poli(laktid)
	Poli(laktid-ko-glikolid)
	Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
	Poli(izobütilsiyanoakrilat)
	Poli(izoheksilsiyanoakrilat)
	Poli(n-bütilsiyanoakrilat)
	Poli(akrilat)
Doğal polimerler	Poli(metakrilat)
	Kitosan
	Aljinat
	Jelatin
Blok kopolimerler	Albümin
	Poli(laktid)-poli(etilen glikol) (PLA-PEG)
	Poli(epsilon-kaprolakton)- poli(etilen glikol) (PCL-

	PEG) Poli(heksadesilsiyanoakrilat)-ko-poli(etilen glikol) (PHDCA-PEG)
Kolloidal stabilizanlar	Dekstran Poli(vinil alkol) Tween <sup>®</sup> 20 veya Tween <sup>®</sup> 80

Tablo 2.1.'de nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerik bileşenler görülmektedir. Aşağıda, sadece tez kapsamında bulunan formülasyonların geliştirilmesinde kullanılan PLGA ve PCL polimerlerine ilişkin açıklayıcı bilgi verilecektir.

#### 2.1.2.1. Poli(laktid-ko-glikolik asit) (PLGA)

Toksik olmayan metabolitlere dönüşen polimerler, uzun etkili ve kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir. Biyoparçalanır laktik asit, glikolik asit ve bunların kopolimerleri, ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (32, 33).

Polilaktid-ko-glikolidler, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin uygun karışımlarının polimerizasyonu sonucu elde edilen kopolimerlerdir. Kopolimeri oluşturan monomerlerin oranları değiştirilerek, farklı molekül ağırlıkta, farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler taşıyan PLGA'lar elde edilebilmektedir. Polimerik matriks olarak ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan PLGA'ların özelliklerine bağlı olarak, ilaç salımının uzatılması ve kontrollü gerçekleştirilebilmektedir (34-36). PLGA'nın kristal yapısı kopolimer zincirindeki iki monomer bileşeninin molar oranına bağlıdır. PLGA'da, % 70'den az PGA içeren kopolimerler amorfür ve diklorometan, etil asetat gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler (37). Sudaki parçalanma oranı ise molekül ağırlığına ve laktid:glikolid oranına bağlıdır, yüksek glikolid içeriği ve düşük molekül ağırlığı, parçalanma oranını artırmaktadır (38).

PLGA, fizyolojik ortamda inert olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyoyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle, yeni ilaç

taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış bir biyopolimerdir. PLGA kopolimerleri gerek yağda, gerekse suda çözünen etkin maddeler ile nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında uygun taşıyıcılardır (39-42).

Farklı terapötik etkinlikteki pek çok düşük veya yüksek molekül ağırlıklı, hidrofilik ve hidrofobik etkin maddeler PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilebilirler. PLGA nanopartikülleri oral, intravenöz, intra-arteriyal, nazal ve inhalasyon yoluyla ilaç taşınmasında uygulanabilmektedir (38).

PLGA nanopartikülleri i.v. uygulamadan sonra karaciğerde bulunan mononükleer fagositik sistem tarafından sistemik dolaşımdan uzaklaştırılır. PLGA nanopartikülleri hücreye endositoz ile alınmakta ve sitoplazmada toplanmaktadır. PLGA vücutta laktik asit ve glikolik asit monomerlerine parçalanmakta, bunlar da sitrik asit döngüsüne girmek suretiyle metabolize olarak CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O olarak elimine edilmekte, glikolik asit ise böbrekler tarafından uzaklaştırılmaktadır (34).

#### **2.1.2.2. Poli-ε-Kaprolakton (PCL)**

Poli-ε-kaprolakton (PCL) FDA onaylı, biyoparçalanır, biyogeçimli ve poliester yapıda, yarı kristal bir polimerdir. Camsı geçiş sıcaklığı -60°C'dir ve erime derecesi, kristal yapısına bağlı olarak 59 ile 64°C arasında değişmektedir. Ortalama molekül ağırlığı 10.000-42.500 Da arasındadır. PCL'nin yavaş olarak parçalanması mikroküre, nanoküre ve implant şeklinde farklı taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasına olanak sağlamıştır (43, 44). PCL parçalanması iki aşamalı kütle erozyonuna dayanmakta, ilk aşamada zincir ayrılması ile 5.000 Da'a kadar kayıp oluşması, ikinci aşamada ise kütle kaybı gözlenmektedir. Parçalanma, fizyolojik şartlarda enzimatik reaksiyon veya ester bağlarının hidrolizi ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle implante edilebilir biyomateryal ve doku onarım iskelesi olarak büyük ilgi çekmektedir. PCL nanopartikülleri ise, i.v. uygulama sonrası retikuloendotelial sistemdeki makrofajlar tarafından elimine edilmektedir. PCL; selüloz propiyonat, selüloz asetat bütirat, polilaktik asit, polilaktik asit-ko-glikolik asit ile kombine halde kullanılmaktadır ve bu sayede salım özellikleri değiştirilebilmektedir (44-46).

### 2.1.3. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan polimerin tipi, sürfaktan varlığı ve formülasyonda kullanılma oranı, dondurarak kurutma işlemi yapılıyor ise kriyoprotektan kullanılması gibi faktörler nanopartikülün yapısını ve özelliklerini etkileyebilmektedir (2).

Nanopartiküllerin hazırlanmasında Bölüm 2.1.1'de anlatıldığı şekilde nanoküre veya nanokapsül yapısında partiküller elde edilmektedir (25). Nanopartiküller (47):

- 1- Misel polimerizasyonu
- 2- Sulu ortamda polimerizasyon
- 3- Yüzeylerarası polimerizasyon
- 4- Koaservasyon
- 5- Etkin maddenin nanopartiküllere adsorpsiyonu
- 6- Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma tekniği
- 7- Nanopresipitasyon (küresel kristalizasyon) metodu
- 8- Tuzla çöktürme (*Salting-out*) metodu

olmak üzere literatürde çok farklı teknikler kullanılarak hazırlanmıştır (48-63).

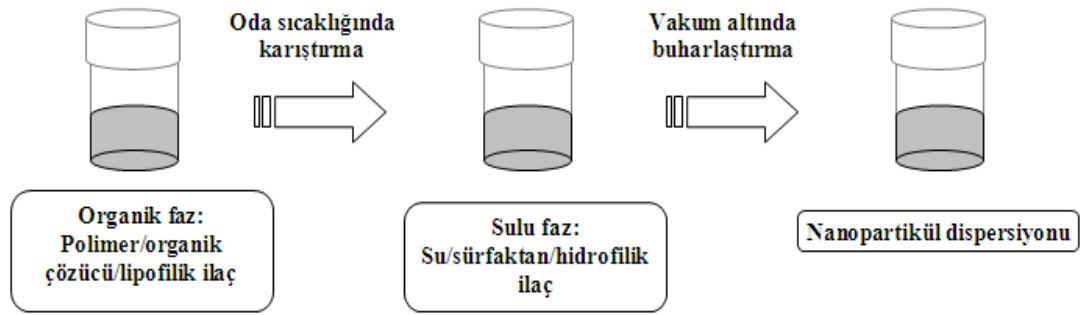
Etkin madde yüklü nanopartikülleri hazırlamak için, polimerin ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine uygun yöntemi seçmek gerekmektedir. Hazırlama esnasındaki formülasyon şartları, polimerik kolloidal sistemin iç yapısını belirlemektedir. Sonuçta oluşan farklı karakterdeki nanoküre veya nanokapsül formlarının in vitro salım davranışları da farklılık göstermektedir (56). Çalışmamızda kullanılan nanopresipitasyon metodu, bu bölümde ayrıntılı olarak incelenecektir.

#### 2.1.3.1. Nanopresipitasyon (Küresel Kristalizasyon) Metodu

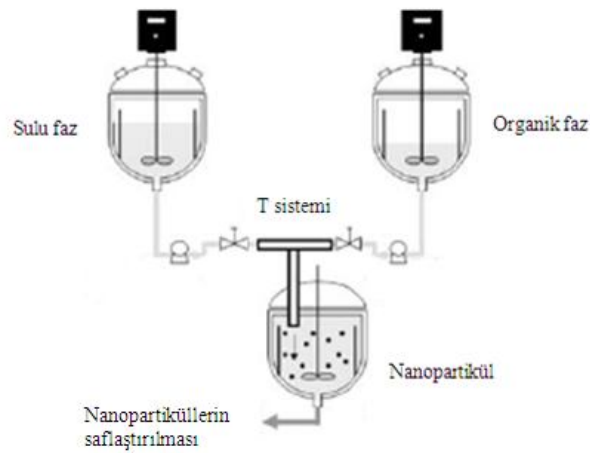
Bu yöntemde, organik faz, iç su fazında tamamen çözünmektedir. Bu nedenle, buharlaştırma veya çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemlere gerek kalmadan nanoküreler ortamda çökmektedir. Yöntemin esasına göre, polar olmayan çözücü

içerisindeki polimer, yarı-polar özellikte çözücüdeki etkin maddenin organik fazda çözünmesini sağlamakta ve polimer-etkin madde yapısının hemen çökmesine neden olmaktadır. Şekil 2.3’de nanopresipitasyon metoduna göre laboratuvar koşullarında düşük miktarlarda ve endüstriyel boyutta büyük miktarlarda nanopartiküllerin hazırlanması şematik olarak gösterilmektedir (64).

Nanopresipitasyon yöntemi ile hidrofobik özellikteki polimer içerisine hem hidrofobik hem de hidrofilik etkin maddeleri enkapsüle etmek mümkün olmaktadır. Etkin maddeleri çezecek çözücü, hem polar hem de polar olmayan özellikte olabilmektedir. Bu yöntem ile nanopartikül hazırlamada toksik yardımcı maddelerin kullanılma gereğinin bulunmaması nanopresipitasyon metodunun önemli bir üstünlüğü olarak belirtilebilir (64).



(A)



(B)

Şekil 2.3. Nanopresipitasyon metoduna göre nanopartikül hazırlanmasının şematik gösterimi (A: Laboratuvar koşullarında, B: Büyük ölçekte hazırlama)

#### 2.1.4. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Son yıllarda, nanopartiküller boyutlarının küçük olması, sıvı dozaj şekillerinde tekdüze dağılması ve etkin maddeyi uzun sürede serbestleştirebilmesi gibi bazı nedenlerle sağlık bilimleri alanında ve diğer alanlarda yoğun araştırma konusu olmaktadır. Sağlık bilimleri alanında özellikle antikanser ilaçlar, antiinflamatuvar ilaçlar, antiparaziter ilaçlar, peptit ve proteinleri taşıyıcı sistem olarak, ayrıca, aşılar ve tanı maddeleri olarak kullanılırken; veteriner hekimlikte de yaygın uygulama alanı bulmaktadır (62, 63). Veterinerlikte özellikle, hayvanları parazitlere karşı korumak için içme suyu içinde verilen ve barsakta parçalanarak ilacı serbestleştiren nanopartiküller kullanılmaktadır (47). Antijen taşıyan nanopartiküllerin ise, immünolojide etkilerinin ümit verici olduğu bildirilmiştir (65). Bazı antiinflamatuvar ilaçlar için, nanopartiküllerle i.v. verilmeleri durumunda etkinin önemli ölçüde artırıldığı gösterilmiştir (66). İnsülin taşıyan nanopartiküllerin oral yoldan uygulanması ile plazma glukoz seviyesinin indirildiği gösterilmiştir. Böylece, biyoparçalanır sistemlerle insülinin enkapsülasyonu sayesinde, bu hormonun gastrointestinal kanaldaki proteolitik parçalanmasının önüne geçilebileceği saptanmıştır (67).

Tıp alanında sitostatik ilaçların nanopartiküler uygulamaları ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (4, 7) ve nanopartiküller, sitostatik ilaçlar için ideal taşıyıcı sistem adayları olarak bildirilmiştir (59). Zira, nanopartiküller vücutta parçalanabilmekte, dolayısıyla dokularda birikmemekte ve birikime bağlı yan etkiler göstermemektedir, ayrıca hedef bölgede yoğunlaşması sağlanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada nanopartiküllerin lenf düğümlerindeki makrofajlar tarafından tutularak yoğunlaştırıldığı ve böylece lenf modüllerindeki metastazlara karşı tedavi sağlandığı gösterilmiştir (17).

Ticari olarak ilaç piyasasındaki onaylanmış nano boyuttaki taşıyıcı sistemlere örnek olarak Estrasorb<sup>®</sup>, Copaxone<sup>®</sup> ve Abraxane<sup>®</sup> verilebilir. Estrasorb<sup>®</sup> da etkin madde olan östrojen miseller nanoteknolojisine göre hazırlanmış, daha sonra topikal emülsiyon şeklinde formüle edilmiştir. Copaxone<sup>®</sup> ise multiple skleroz tedavisinde kullanılan, glatiramer asetat içeren nanopartiküler bir ilaç taşıyıcı sistemdir. Abraxane<sup>®</sup>, ilaç piyasasında FDA tarafından ruhsatlandırılmış olarak bulunan,

antikanser ilaç içeren bir nanopartikül preparatıdır. Bu farmasötik ürün, albumin konjuge edilmiş paklitaksel içeren bir nanopartikül formülasyonudur. Abraxane<sup>®</sup>, kemoterapinin tamamlanmasından sonraki altı ay içinde tekrarlayan durumlarda veya kombinasyon tedavisine cevap vermeyen metastatik meme kanserinin tedavisi için kullanılmaktadır. Formülasyonunda herhangi bir sürfaktan veya çözücü içermemektedir. Abraxane<sup>®</sup> ile paklitakseli plazmaya uzun sürede sürekli olarak vererek depo etkisi sağlamak mümkündür. Bu şekilde, infüzyon süresi kısaltılmış olur ve standart Taxol<sup>®</sup> formülasyonunda gözlenen akut toksisite reaksiyonları gözlenmeyebilir. Abraxane<sup>®</sup> tek kullanımlık ambalajlarda, 100 mg paklitaksel ve 900 mg insan albumini içermektedir. Her vial, 20 mL % 0.9'luk NaCl injeksiyonu ile yeniden yapılandırılarak, 3 haftada bir 30 dakikadan uzun süre ile i.v. olarak verilmektedir. Yeniden yapılandırılmış süspansiyonun mL'si 5 mg paklitaksel içermektedir (68).

### **2.1.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri**

Nanopartiküllerin karakterizasyonu amacıyla partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, yüzey özelliği, ilaç yükleme kapasitesi ve etkin madde salımı incelenmektedir (69-77).

#### **2.1.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı**

10-1000 nm arasında partikül boyutuna sahip olan nanopartiküllerde partikül büyüklüğü dağılımı Coulter Nanosizer ve Malvern cihazlarıyla yapılmaktadır (73). Bu cihazlarda, foton korelasyon spektroskopisi ve lazer difraksiyon metodlarına dayanarak partikül büyüklüğü dağılımları tespit edilmektedir. Foton korelasyon spektroskopisi, mikron altı partiküllerin Brown hareketleri sebebiyle lazer ışının yansımadaki Doppler kaymalarını izleyen bir tekniktir. Çok kısa sürelerde elde edilen bu şiddet değişimi ışığı saçan partiküllerin ağırlık dağılımı ile ilgili bilgi edinmek için "oto-korelasyon"a tabi tutulmaktadır. Bu hesaplamalar sonucu partikülün ortalama büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ile ilgili bilgiler elde edilmektedir. Lazer difraksiyon yöntemi ise difraksiyon açısının partikül büyüklüğü ile ters orantılı olması esasına dayanan bir tekniktir. Bu yöntemde, sabit dalga

boyunda şiddetli bir lazer ışını örnek partiküllerden geçirilmekte ve ışık şiddeti verisi lazer ışınının ekseninden uzaktaki farklı (düşük) saçılma açılarında toplanmaktadır. Partikül büyüklüğü azaldıkça gözlenen saçılma açısı logaritmik olarak büyümektedir. Büyük partiküller ışığı daha dar açıda daha yüksek şiddet ile saçarken, küçük partiküller daha geniş açıda ama daha düşük şiddette saçmaktadırlar (42).

#### **2.1.5.2. Zeta Potansiyel**

Nanopartiküllerde zeta potansiyel, kolloidal dispersiyonların dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir (72). Partikül yüzeyindeki elektriksel yükü açıklayan zeta potansiyel, nanopartikül ile dispersiyon ortamı ara yüzeyindeki farklı sistem bileşenlerinin yüklerinden etkilenmektedir. Genellikle,  $\pm 30$  mV ile  $\pm 10$  mV arasındaki zeta potansiyel değerleri, agregasyonu önleyen, partiküller arasındaki yüksek itiş gücü nedeni ile daha dayanıklı nanopartikül dispersiyonlarını göstermektedir.

#### **2.1.5.3. Yüzey Özellikleri**

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri, nanometre boyutlarında oldukları için sadece elektron mikroskopları ile incelenebilmektedir. Bu amaçla kullanılan cihazlar taramalı elektron mikroskopu (scanning electron microscopy-SEM), atomik kuvvet mikroskopu (AFM), transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ve taramalı tünel mikroskopu (STM) olarak sıralanabilir. Araştırma esnasında en iyi görüntülemeyi sağlayan yöntem, amaca en uygun yöntem olarak değerlendirilmektedir. Nanopartiküllerin yüzey alanı tayininde ise gaz adsorpsiyonu yöntemi kullanılmaktadır.

#### **2.1.5.4. İlaç Yükleme Kapasitesi**

Nanopartiküler sistem formülasyonlarının önemli özelliklerinden birisi de ilaç yükleme yüzdeleridir. Etkin madde, partikül içine hapsedilebileceği gibi yüzeye de adsorbe edilebilmektedir. Genel olarak, enkapsülasyon yüzdesinin etkin maddenin yağlı iç çekirdekteki çözünürlüğü ile ilişkili olduğu bilinmektedir (70). Hapsolan ilaç miktarı; nanopartikül dispersiyonu içerisinde saptanan total ilaç miktarı olarak tanımlanabilmektedir. Asosiye ilaç yüzdesi (%) ve hapsolma etkinliği ( $\mu\text{g}$  ilaç / mg

siklodekstrin) değerleri, hapsolan etkin madde miktarından hareketle hesaplanmaktadır (70).

#### **2.1.5.5. İn Vitro Etkin Madde Salımı**

Nanopartiküllerde başlangıçta hızla salınan etkin maddenin nanopartikülün yüzeyine adsorbe olan ilaç olduğu ve daha sonra salınan miktarın nanopartiküle enkapsüle olan kısım olduğu ve salımın genellikle birinci derece kinetiğine uyduğu görülmektedir (2). İlacın salımında, nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan monomer miktarının ve polimerik duvar kalınlığının etkili olduğu bildirilmektedir (8).

Nanopartiküllerden etkin maddenin salımını etkileyen parametreler aşağıdaki gibi sıralanabilir (2):

- Etkin maddenin çözünürlüğü,
- Yüzeğe adsorbe olan etkin maddenin desorpsiyonu,
- Nanopartiküler matriksten etkin maddenin difüzyonu,
- Nanopartikülün matriks yapısının erozyonu/degradasyonu,
- Kombine erozyon/difüzyon metodu

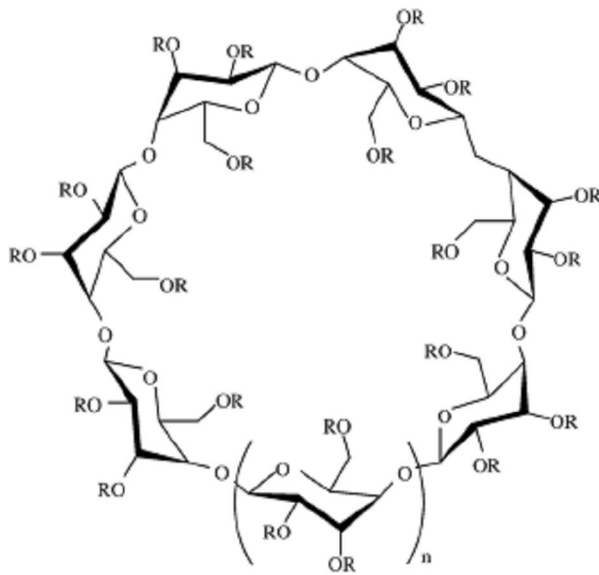
Nanopartiküllerden ilaç salımı, genellikle sızma, aşınma, kopma-parçalanma ve difüzyon mekanizmalarıyla açıklanmaktadır. Partikül boyutunun küçük olmasından dolayı difüzyon mesafesi çok kısa olmaktadır ve bu durumda difüzyon mekanizmasının çok etkili bir parametre olmadığı bildirilmektedir (11). Degradasyon mekanizması kimyasal veya enzimatik olarak gerçekteşmektedir. Nanopartiküllerden etkin madde salımının tayini için çeşitli metodlar kullanılmaktadır (2). Küçük boyutlarda olmalarından dolayı nanopartiküllerin alınan örneklerdeki salım ortamından santrifüj ile uzaklaştırılmaları yani çöktürülmeleri gerekmektedir. Nanopartiküllerden etkin madde salımı genellikle diyaliz metodu ile yapılmaktadır. Bu metoda göre nanopartikül süspansiyonu bir diyaliz membranına veya tübüne yerleştirilmekte ve salım ortamında çalkalanmaktadır. Salım ortamındaki etkin

madde miktarı zamanın fonksiyonu olarak tayin edilmektedir (78). İn vitro salım tayininde kullanılan diğer yöntemler endorf tüp metodu, biyolojik veya yüzeylerarası membranlar ile yan yana difüzyon hücresi metodu, ters diyaliz tekniği, ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon, santrifüje dayalı ultrafiltrasyon ve mikrodiyaliz teknikleridir (8, 64).

## 2.2. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler ilk olarak 1891 yılında Villiers tarafından keşfedilmiştir (79). Kimyasal yapılarının aydınlatılması ile enkapsülasyon ajanı olarak ve endüstride ekspiyen olarak kullanımları önem kazanmıştır (80).

Siklodekstrinler, endüstriyel olarak üretilen ve nişastanın siklodekstrin glukozil transferaz (CGTaz) aracılığı ile enzimatik parçalanması sonucu elde edilen siklik oligosakkaritlerdir. Doğal siklodekstrinler ise glukopiranoz birimlerinden meydana gelen; makrohalka şeklinde, kristalize, homojen maddelerdir (81). Siklodekstrinler, moleküldeki  $\alpha$ -1,4-D(+)-glukozidik bağı glukopiranoz birimlerinin sayısına göre adlandırılmaktadır. Bunlar arasında farmasötik açıdan önem taşıyan  $\alpha$ -siklodekstrin (6 birim),  $\beta$ -siklodekstrin (7 birim) ve  $\gamma$ -siklodekstrin (8 birim) Şekil 2.4'de şematik olarak açıklanmaktadır (82, 83).



Siklodekstrin	n	R
$\alpha$ -CD	0	H
$\beta$ -CD	1	H
$\gamma$ -CD	2	H

Şekil 2.4. Siklodekstrinlerin genel yapısı

Siklodekstrinler; hidrofilik dış yüzey ile apolar bir kaviteden oluşan özel bir yapıdır. Kavitenin içindeki glukozidik gruplar yapıya hidrofobik özellik kazandırmaktadır. Siklodekstrinler, konuk ilaç molekülleri ile inklüzyon bileşiklerini oluşturma özelliğine sahiptirler (84-89). Tablo 2.2’de siklodekstrinlerin fizikokimyasal özelliklerine ve farmakope monograflarına ilişkin bilgiler verilmiştir (90).

Tablo 2.2. Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özelliklerine ve farmakope monograflarına ilişkin bilgiler

Siklodekstrin tipi	Süstitüsyon derecesi	Molekül ağırlığı (Da)	Sudaki çözünürlüğü (mg/mL)	Referans farmakope (Kayıt durumu)		
				Avrupa Farm.- 5.Baskı (2005)	Amerikan Farm. - 28.Baskı (2005)	Japon Farm. (1997)
$\alpha$ -CD	-	972	145	+	-	+
$\beta$ -CD	-	1135	18.5	+	+	+
HP- $\beta$ -CD	0.65	1400	>600	+	+	-
RM- $\beta$ -CD	1.8	1312	>500	-	-	-
SBE- $\beta$ -CD	0.9	2163	>500	-	-	-
$\gamma$ -CD	-	1297	232	Çalışmalar devam ediyor	+	+
HP- $\gamma$ -CD	0.6	1576	>500	-	-	-

+: Var, -:Yok

Doğal siklodekstrinler özel bir kristal yapı göstermektedirler. Siklodekstrin halkasında bulunan glukoz üniteleri ekvatoryal pozisyonda oldukları için, termodinamik olarak istenen  ${}^4C_1$  sandalye konformasyonundadırlar. Ayrıca,

siklodekstrinler C(4)-O(4) ile C(1)-O(4) arasındaki glukozidik bağların ve C(1)-O(4) arasındaki O(6) primer hidroksil gruplarının rotasyonu ile bükülmez yapı göstermektedirler. Bu konformasyon sonucunda, C(2) ve C(3)'e bağlı tüm sekonder hidroksil grupları, ekvatoryal konumda siklodekstrin kavitesinin geniş olan tarafında yer almaktadırlar. C(2)'ye bağlı hidroksiller kaviteye doğru, C(3)'e bağlı hidroksiller ise kaviteden dışarı doğru yönelmişlerdir. Kavitenin daha dar olan kısmında C(6)'ya bağlı primer hidroksil grupları bulunmaktadır. Bu hidroksil grupları, doğal siklodekstrinler için iyi derecede suda çözünürlük sağlamaktadırlar. Kavitede, C-H gruplarının (C3), glukozidik oksijen atomlarının ve diğer C-H gruplarının (C5) halkası aynı hizada bulunmaktadır. Bu nedenle, kavite apolar bir karaktere sahiptir, bu durum yüksek elektron dansitesi ve Lewis bazı özelliğinden kaynaklanmaktadır. Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri ile inklüzyon kompleksi oluşturma özellikleri, bu özel kimyasal yapının sonucudur (84).

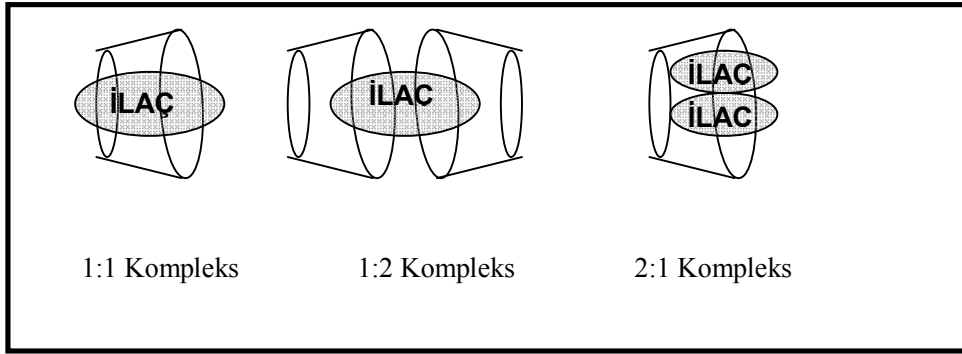
Siklodekstrinlerin, “Ying-Yang” olarak da adlandırılan çift karakterli yapısından dolayı, farmasötik alanda çok geniş kullanımları vardır. Siklodekstrinler, hidrofobik molekülleri apolar kavitesine hapsederek fizikokimyasal özelliklerini maskeleymektedirler (83, 85). Siklodekstrinler ile etkin maddenin hidrofobik fonksiyonları gizlenerek suda çözünür etkin madde:siklodekstrin kompleksleri elde edilebilmektedir. Siklodekstrinler, çözünürlüğü düşük etkin maddelerin biyoyararlanımını; etkin maddenin çözünürlüğünü, çözünme hızını ve/veya etkin madde permeabilitesini artırarak iyileştirmektedirler. Düşük çözünürlüğe sahip hidrofobik ilaçların permeabilitesini ise biyolojik bariyerlerin yüzeyinde yüksek miktarda ilaç bulunmasını sağlayarak artırmaktadırlar (83). Siklodekstrinler eczacılıkta ayrıca stabilitenin düzeltilmesi, yan etkilerin azaltılması, kötü tat veya kokunun maskelenmesi, sıvı ilaçların katı hale dönüştürülmesi, uçuculuğun azaltılması, geçimsiz ilaçların bir arada verilebilmesi gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır (91).

Kompleksi hazırlanan etkin maddenin çözünürlüğü; etkin maddenin ve siklodekstrinin büyüklüklerinin uygunluğuna, etkin maddenin lipofilikliğine ve kovalan olmayan etkileşimleri sağlayan elektrik yüküne bağlı olarak değişmektedir. Siklodekstrinler, etkin madde ile kovalan olmayan etkileşimlerde bulunarak çözelti içerisinde etkin maddenin kimyasal potansiyelinin azalmasına yol açmaktadır. Bu

kovalan olmayan ve spesifik çözünürlüğü artırıcı etkileşimler “benzer benzeri çözer” yaklaşımına dayanmaktadır (92). Siklodekstrin kavitesine girebilecek molekülün saptanmasında kimyasal faktörlerden çok geometrik faktörler rol oynamaktadır.

Moleküllerin siklodekstrinlerle kompleksleşmesi, molekülün devamlı olarak kompleksin içerisine dahil olduğu ve kompleksten ayrıldığı dinamik bir işlemdir. En olası bağlanma şekli, konuk molekülün daha az polar bölümünün siklodekstrin kavitesinin içerisine girmesi, daha polar ve çoğunlukla yüklü olan grubun ise kavitenin daha geniş olan kısmının hemen dışındaki çözücüye doğru yönelmesidir (93).

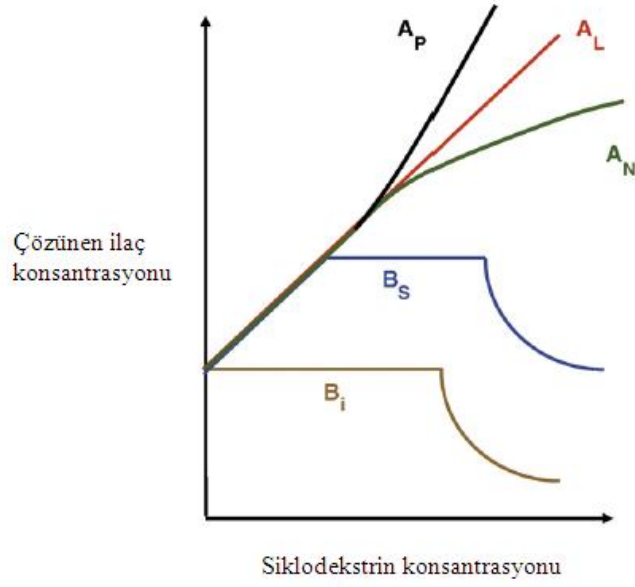
Siklodekstrinlerin hidrofobik ilaçlarla inklüzyon kompleksi oluşumu denge reaksiyonuna dayanmaktadır (94-98). Reaksiyon, kantitatif olarak bir asosiasyon veya stabilite sabiti ( $K_{a,b}$ ) ile açıklanmaktadır. Sabitedeki a ve b değerleri, kompleksleşen ilaç molekülünün siklodekstrine olan molar oranını göstermektedir (99-101). Bu sabitenin büyüklüğü, siklodekstrinlerin etkinliğini karşılaştırmada bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Kullanılan siklodekstrin tipine ve etkin maddenin büyüklük ve fizikokimyasal özelliklerine göre farklı molar oranlarda kompleksler oluşabilmektedir. İlaç kaviteye tam olarak uyarsa, 1:1 kompleks oluşur, ancak eğer ilaç boyutları çok büyükse, ilaç molekülünü çevrelemek için birden fazla siklodekstrin molekülü gerekmektedir. Bu durumda, 1:2 veya daha fazla oranda kompleksler oluşmaktadır. Eğer kavite yeterince büyükse, 2 ilaç molekülü de kavite içerisine alınabilir (2:1 kompleks). Farklı molar oranlardaki inklüzyon kompleksleri Şekil 2.5’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.5. Farklı molar oranlarda ilaç:siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin şematik gösterimi (85)

Siklodekstrinlerle etkin maddelerin inklüzyon bileşiklerinin hazırlanmasında en sık kullanılan ve en güvenilir yöntem, sulu çözeltiliden kompleksin izole edildiği metoddur. Bu yöntemde, etkin madde ve siklodekstrin su içinde dengeye ulaşana kadar karıştırılmaktadır. Daha sonra inklüzyon kompleksi toz halde çöktürülmekte ve kurutulmaktadır. Bu yöntem büyük ölçekli üretim için uygun olmadığından endüstriyel alanda yoğurma (*kneading*), dondurarak kurutma (*freeze drying*), püskürterek kurutma (*spray drying*), çöktürme (*coprecipitation*), nötralizasyon ve öğütme (*grinding*) gibi yöntemler kullanılmaktadır (86, 87).

İnklüzyon kompleks oluşturma ve karakterizasyon çalışmalarında kompleksteki etkin madde:siklodekstrin molar oranının belirlenmesi ve asosiyasyon katsayısının hesaplanması için en yaygın yaklaşım Higuchi ve Connors'un (102) tanımladığı faz çözünürlük çalışmasıdır. Bu çalışma, siklodekstrin gibi çözünürleştiricilerin etkisinin tayin edildiği bir yöntemdir. Faz çözünürlük diyagramları A ve B tipi olarak kategorize edilmektedir (Şekil 2.6). A tipi eğriler suda çözünen inklüzyon komplekslerini gösterirken, B tipi zayıf çözünürlüğü olan kompleksleri tanımlamaktadır. A ve B<sub>S</sub> tipleri sınırlı çözünürlüğü; B<sub>I</sub> ise çözünmeyen kompleksleri göstermektedir. A tipi kompleksler A<sub>L</sub> (siklodekstrin konsantrasyonuna bağlı olarak çözünürlüğün doğrusal artması), A<sub>P</sub> (pozitif sapma gösteren izoterm) ve A<sub>N</sub> (negatif sapma gösteren izoterm) olarak alt birimlere ayrılmaktadır. β-CD gibi sudaki zayıf çözünürlüğü olan siklodekstrinler bazen B tipi eğriler verirken, HP-β-CD ve SBE-β-CD gibi suda çözünen siklodekstrinler A tipi eğriler vermektedir (95).



Şekil 2.6. Teorik faz çözünürlük diyagram tipleri (95)

1:1 kompleksleri için aşağıdaki eşitlik kullanılarak asosiyasyon (stabilite) katsayısı hesaplanmaktadır:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Eğim}}{\text{So} (1 - \text{Eğim})}$$

K= Asosiyasyon (stabilite) katsayısı

So= Etkin maddenin gerçek (*intrinsik*) çözünürlüğü

İlaç ve siklodekstrin 1:1 kompleksinin eşitliği:

İlaç + siklodekstrin  $\leftrightarrow$  İlaç : siklodekstrin kompleksi

şeklinde gösterilmektedir. Bu eşitliğin bağlanma yarı ömrü bir saniyeden daha az bir süredir. Asosiyasyon katsayısı K, etkin madde:siklodekstrin kompleksleri için genellikle 100-20.000 M<sup>-1</sup> arasında değişmektedir (95).

### 2.2.1. Siklodekstrin İçeren Nanopartiküller

Siklodekstrinler de nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarında kullanılmaktadır (103-111). Siklodekstrinlerin nanopartikül yapısına girmesi iki şekilde gerçekleştirilmektedir:

1. Etkin maddenin siklodekstrin ile hazırlanan kompleksinin polimerik nanopartiküllere enkapsüle edilmesiyle, ilacın çözünürlüğü artırılır ve/veya stabilitesi düzeltilir.
2. Siklodekstrinlerin modifikasyonu ile bu moleküllere amfifilik özellik kazandırılır. Bu durumda, yüzey aktif madde kullanılarak veya kullanılmadan nanopartiküllerin; nanoküre, nanokapsül, katı lipid nanopartikül, lipozom, vezikül gibi formlarda oluşması sağlanmaktadır (91).

Siklodekstrin içeren ilk farmasötik ürün, 1976 yılında, Japonya'da piyasaya çıkan prostaglandin E2/ $\beta$ CD içeren dilaltı tabletidir (Prostarmon E™). Bundan 12 yıl sonra Avrupa'da piroksikam/ $\beta$ CD içeren (Brexin®) tablet piyasaya sunulmuştur. Amerika'da ise onay alan ilk ürün itrakonazol/2-hidroksipropil- $\beta$ CD oral çözeltisidir. Bugün dünya piyasasında siklodekstrin içeren 35 farklı farmasötik ürün bulunmaktadır (Tablo 2.3). Bu preparatlarda siklodekstrin etkin maddelerin sudaki çözünürlüğünü, biyoyararlanımını ve/veya stabilitesini artırmak gibi amaçlarla kullanılmıştır (83).

Tablo 2.3. Siklodekstrin içeren ruhsatlandırılmış farmasötik ürünler

İlaç/Siklodekstrin	Ticari İsmi®	Dozaj Şekli	Ruhsatlandırıldığı Ülke
<b><math>\alpha</math>-Siklodekstrin</b>			
• Alprostadil (PGE1)	Prostavastin, Rigidur	i.v. çözelti	Japonya, Avrupa, ABD
• OP-1206	Opalmon	Tablet	Japonya
• Sefotiam heksetil HCl	Pansporin T	Tablet	Japonya

<b><math>\beta</math>-Siklodekstrin</b>			
• Beneksat HCl	Ulgut, Lonmiel	Kapsül	Japonya
• Sefalosporin (ME 1207)	Meiact	Tablet	Japonya
• Klordiazepoksit	Transillium	Tablet	Arjantin
• Deksametazon	Glymesason	Merhem	Japonya
• Difenhidramin HCl, Klorteofilin	Stada-Travel	Çiğneme tableti	Avrupa
• İyot	Mena-Gargle	Çözelti	Japonya
• Nikotin	Nicorette, Nicogum	Dilaltı tablet, Çiğneme sakızı	Avrupa
• Nimesulid	Nimedex	Tablet	Avrupa
• Nitrogliserin	Nitropen	Dilaltı tablet	Japonya
• Omeprazol	Omebeta	Tablet	Avrupa
• PGE2	Prostarmon E	Dilaltı tablet	Japonya
• Piroksikam	Brexin, Flogene, Cicladon	Tablet, Supozituar, Çözelti	Avrupa, Brezilya
• Tiaprofenik asit	Surgamyl	Tablet	Avrupa
<b>2-Hidroksipropil-<math>\beta</math>-Siklodekstrin</b>			
• Sisaprid	Propulsid	Supozituar	Avrupa
• İtrakonazol	Sporanox	Oral ve i.v. çözelti	Avrupa, ABD
• Mitomisin	Mitozytrex	i.v. çözelti	Avrupa, ABD
<b>Metilenmiş-<math>\beta</math>-Siklodekstrin</b>			
• Kloramfenikol	Clorocil	Göz damlası	Avrupa

• 17 $\beta$ -Estradiol	Aerodiol	Burun spreyi	Avrupa
<b>Sülfobütiler <math>\beta</math>-Siklodekstrin</b>			
• Vorikonazol	Vfend	i.v. çözelti	Avrupa, ABD
• Ziprasidon mesilat	Geodon, Zeldox	i.m. çözelti	Avrupa, ABD
<b>2-Hidroksipropil-<math>\gamma</math>-Siklodekstrin</b>			
• Diklofenak sodyum	Voltaren	Göz damlası	Avrupa
• Tc-99 Teoboroksim	Cardiotec	i.v. çözelti	ABD

### 2.2.2. Siklodekstrin Türevleri

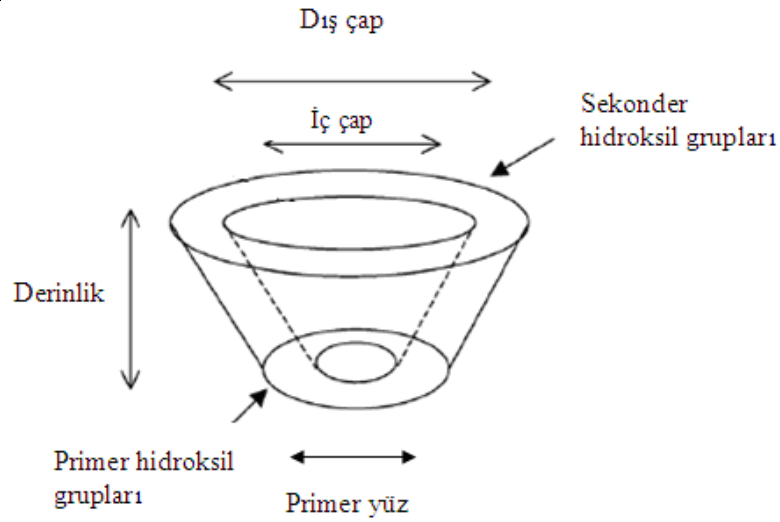
Siklodekstrinlerin 2, 3 ve 6 numaralı konumlarında yer alan hidroksil gruplarına alifatik yapılar bağlanması ile elde edilirler (Tablo 2.4). Doğal siklodekstrinlerin üstünlüklerinin yanında, aşırı lipofilik yüzeyleri biyolojik membranlarla etkileşimini zorlaştırmaktadır. Siklodekstrinlerin modifiye edilme nedenleri arasında:

- Özellikle, suda çözünürlüğü nispeten sınırlı olan  $\beta$ -siklodekstrinin suda çözünürlüğünü artırmak,
- Siklodekstrinlerin biyolojik membranlardan geçişini artırmak,
- Doğal siklodekstrinlerin en önemli yan etkisi olan hemoliz ve nefrotoksisiteyi yok etmek,
- Siklodekstrinler ile kolloidal (nanopartiküler) ilaç taşıyıcı sistem oluşturmak,
- İlaç salım özelliklerini değiştirmek

sıralanabilir (90, 94).

Tablo 2.4. Doğal siklodekstrinlerden  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD'in özellikleri

Siklodekstrin tipi	Glukoz ünite sayısı	Boyutlar (nm)			Halka açılma $t_{1/2}$ (sa)	Ortalama $K_{1:1}$ ( $M^{-1}$ )
		Derinlik	Dış çap	İç çap		
$\alpha$ -CD	6	0.78	1.37	0.57	33	130 $\pm$ 8
$\beta$ -CD	7	0.78	1.53	0.78	29	490 $\pm$ 8
$\gamma$ -CD	8	0.78	1.69	0.95	15	350 $\pm$ 9



$\alpha$  ve  $\beta$  siklodekstrinlerin nefrotoksik etkileri nedeni ile parenteral uygulama için uygun olmadığı bilinmektedir. Bu yan etkinin etiyolojisi halen bilinmemektedir, fakat böbrek tübül hücreleri tarafından siklodekstrin alımını takiben hücre içi fonksiyonun bozulması veya siklodekstrinler tarafından lipid membran bileşenlerinin ekstraksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (107).

Farmasötik alanda ve ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonunda sıklıkla kullanılan siklodekstrin türevleri arasında metilenmiş siklodekstrinler, hidrokspipil siklodekstrinler, sülfobutileter- $\beta$ -siklodekstrinler, dallanmış siklodekstrinler, açillenmiş siklodekstrinler, iyonize siklodekstrinler, karboksimetiletil- $\beta$ -siklodekstrinler ve sülfatlanmış siklodekstrinler sıralanabilir (112-116).

### 2.2.3. Amfifilik Siklodekstrinler

Amfifilik siklodekstrinler, doğal siklodekstrinlerin farmasötik uygulamalardaki bazı sınırlamalarını ortadan kaldırmak için sentezlenmiştir. Amfifilik siklodekstrinlerin sentezlenmesindeki temel nedenler şu şekilde özetlenebilmektedir (117):

1. Moleküle dış hidrofobiklik kazandırılarak siklodekstrinlerin biyolojik membranlarla etkileşimini artırmak,
2. Siklodekstrinlere uzun alifatik zincirler eklenmesi ile hidrofobik ilaçlarla etkileşimini modifiye etmek veya artırmak (inklüzyon kapasitesini artırmak),
3. İntravenöz uygulama sonrası doğal siklodekstrinlerin nefrotoksik ve hemolitik etkisini yok etmek veya azaltmak,
4. Amfifilik siklodekstrinlerin kendi kendine bir araya gelebilme özellikleri sayesinde nano boyuttaki taşıyıcıların oluşumuna olanak sağlamak.

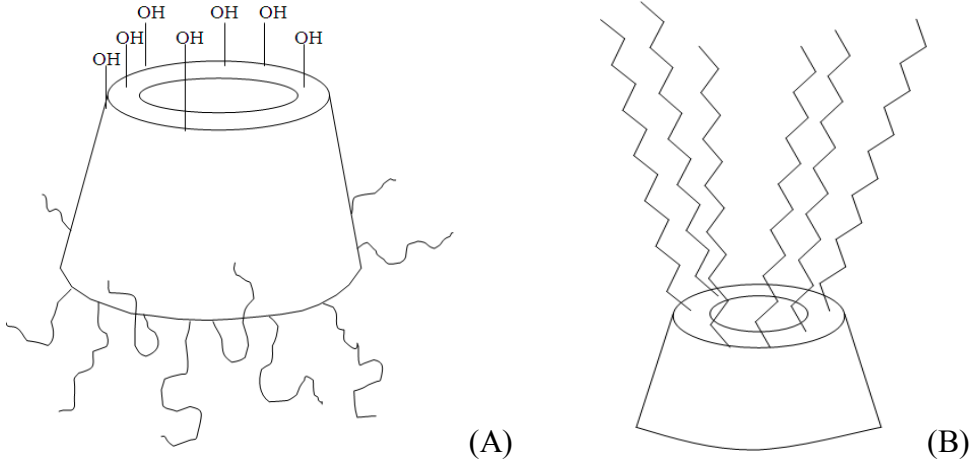
Amfifilik siklodekstrinlerin yüzey aktif özelliklerini alifatik zincirin uzunluğu, yapısı, bağ tipi etkilemektedir. Amfifilik siklodekstrinler ile nanopartiküller herhangi bir polimer, makromolekül veya sürfaktan kullanılmadan kendiliğinden oluşmaktadır (118-124). Hidrofobik molekülleri kavitesine uzun alifatik zincirlerle bağlarlar.

Amfifilik siklodekstrinler yüzey yüklerine göre noniyonik, katyonik ve anyonik siklodekstrinler olmak üzere üç ayrı sınıfa ayrılabilirler (91). Çalışmamızda kullanılan 6-O-Capro- $\beta$ -CD ve  $\beta$ -CDC6 noniyonik yapıda olduğu için bu grup ayrıntılı olarak incelenecektir.

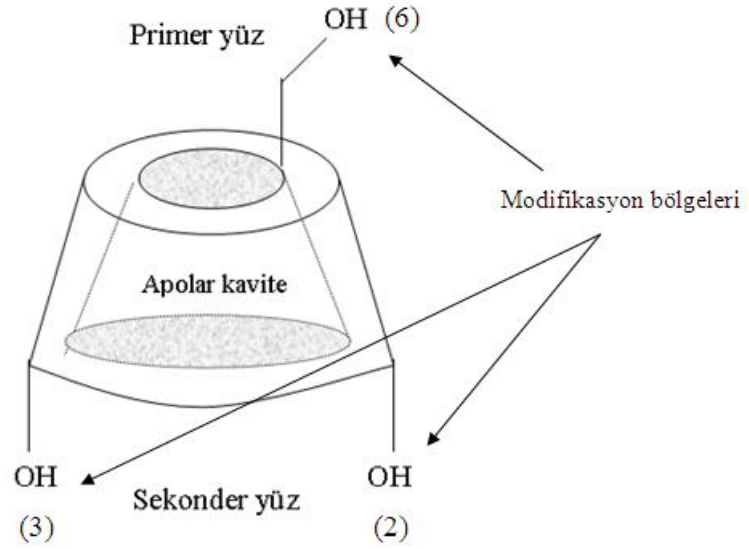
#### *Noniyonik Amfifilik Siklodekstrinler*

Noniyonik amfifilik siklodekstrinler, glukopiranoz ünitelerinin primer ve/veya sekonder yüzlerine farklı uzunluklarda alifatik zincirlerin eklenmesiyle elde edilirler. Siklodekstrinlere yapılan modifikasyonlar Şekil 2.7-2.9'da görülmektedir. Sentez yaklaşımlarında; her iki yüzün modifikasyonu (-2, -3, -6) olabileceği gibi primer yüzün modifikasyonu (-6) (lolipop siklodekstrinler, medusa benzeri siklodekstrinler, kap ve top siklodekstrinlerde olduğu gibi) veya sekonder yüzün

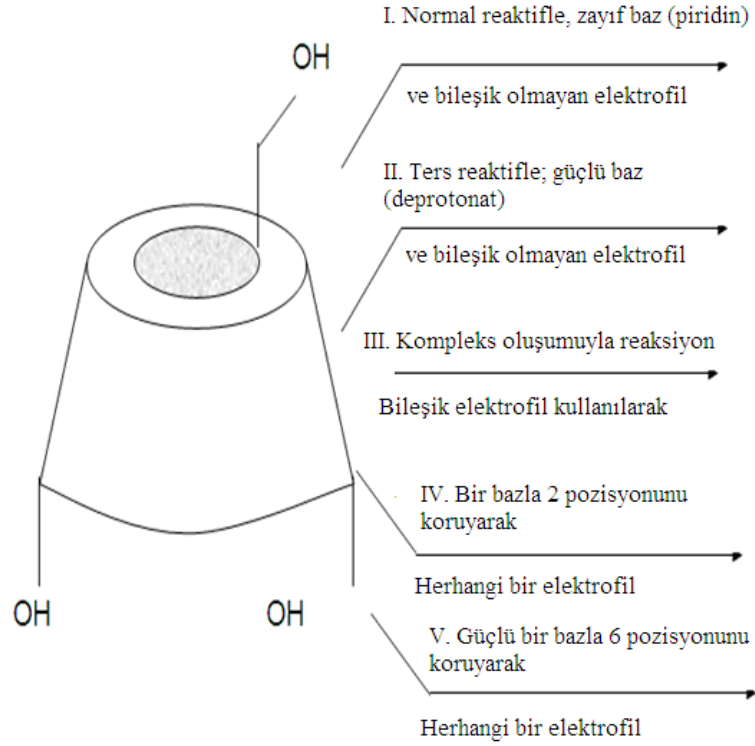
modifikasyonu (-2 ve/veya -3) (etek şeklinde siklodekstrinler, buket şeklinde siklodekstrinlerde olduğu gibi) yapılabilmektedir (104, 106). İsimlendirilmeleri yapılarına göre yapılmıştır:



Şekil 2.7. Siklodekstrinlerin modifikasyonunun şematik gösterimi (A: Sekonder yüzün modifikasyonu, B: Primer yüzün modifikasyonu)



Şekil 2.8. Siklodekstrinlerin primer ve sekonder yüzlerindeki modifikasyon bölgeleri



Şekil 2.9. Siklodekstrinlerde yapılabilecek modifikasyonların şematik gösterimi

#### 2.2.4. İlaç:Siklodekstrin Komplekslerinin Karakterizasyonu

Siklodekstrinlerin ve hazırlanan komplekslerin analizinde diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), termogravimetrik analiz (TGA), fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi, nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopisi, ultraviyole (UV), görünür bölge ve floresans spektroskopisi, dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi ve X-ışını kırınımı (XRD) gibi metodlar kullanılmaktadır (117,119-123). Bütün bu analizler, kompleks oluşumunun gösterilmesi açısından birbirlerini doğrulamak veya desteklemek amacıyla yapılmaktadır.

Diferansiyel taramalı kalorimetri, kalitatif amaçlı kullanılan yöntem olup moleküllerin erime pikinde gözlenen kayıp, kompleks oluşumunun göstergesidir. Etkin maddenin erime pikinin kaybolması, ortamda serbest halde bulunmadığını göstermektedir (117).

Termogravimetrik analiz, kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntem ile konuk molekülün kaynama noktası ve buharlaşan miktarı ölçülebilmektedir (117).

Fourier transform infrared spektroskopisi ile konuk molekülün spektral özelliklerindeki değişimler tespit edilmektedir. Etkin maddeye karakteristik spektrumlardaki küçülme veya kaybolma, etkin maddenin serbest halde kalmadığını veya çok az sayıda molekülün serbest olarak kaldığını göstermektedir (119).

Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi kalitatif ve kantitatif analiz yanında, konuk molekülün kompleks oluşumuna katılan belirli bölümü hakkında da bilgi vermektedir. Kompleks oluşumu sonucu, yeni bir çevrede bulunan siklodekstrin kavitesindeki H-3 ve H-5 protonlarının piklerinde bir kayma gözlenmektedir. Siklodekstrinin dış yüzeyinde bulunan hidrojenler ise genellikle (H-2, H-4, H-6) kompleksleşmeden etkilenmezler. Siklodekstrin spektrumu dışında, konuk molekülün NMR spektrumunda da kayma gözlenebilmektedir (120).

Ultraviyole, görünür bölge ve floresans spektroskopisi ile aromatik halka ve fonksiyonel gruplara sahip konuk moleküllerin, siklodekstrinlerin varlığında, UV ve görünür bölge spektrumlarında maksimumda kayma gösterdikleri bildirilmektedirler (121). Belirli konuk moleküllerin floresans spektrumlarında da benzer sonuçlar elde edilebilmektedir.

Dairesel dikroizm spektroskopisi, maddenin sağ ve sol dairesel polarize ışığı absorplanmasındaki farkı ölçen bir ışık absorpsiyon spektroskopisi çeşididir. Akıral konuk molekülün sulu çözeltisine siklodekstrin eklendiğinde ve konuk molekülün kromofor grubu, siklodekstrin kavitesinin içerisine girdiği zaman, dairesel dikroizm spektrumunda değişiklikler gözlenmektedir (122).

X-ışını kırınımı yöntemi, uçucu olmayan sıvı veya katı konuk moleküller için yararlıdır ve esası maddenin kristal özelliğindeki değişimin incelenmesine dayanmaktadır (122).

### 2.2.5. Siklodekstrinlerin İlaç Taşınmasında Kullanılması

Siklodekstrinler parenteral, oral, oküler, nazal, rektal ilaç taşınmasında, kontrollü ilaç taşınmasında, kolona spesifik ilaç taşınmada, peptit ve protein taşınmasında, gen ve oligonükleotid taşınmasında, dermal ve transdermal taşınmada, beyine ilaç taşınması ve beyine hedeflemede kullanılmaktadır (125-136).

HP- $\beta$ -CD ve SBE- $\beta$ -CD'ler gibi amorf türevler sudaki çok çözünürlüklerinden ve toksisitelerinin çok az olmalarından dolayı parenteral kullanımda çok çalışılan siklodekstrinler olmuşlardır. Amerika ve Avrupa'da piyasada % 40 oranında HP- $\beta$ -CD içeren itrakonazol parenteral preparatı bulunmaktadır (125). Siklodekstrinlerin parenteral uygulanması ile ilacın çözünürlüğü ve ilacın sulu ortamdaki stabilitesi artırılırken, uygulama bölgesindeki ilaç iritasyonu azaltılmış olur. HP- $\beta$ -CD ve SBE- $\beta$ -CD'ler ile mikanozolun, M- $\beta$ -CD ile doksorubisinin parenteral formülasyonları geliştirilmiştir. Dekametazonun dallanmış  $\beta$ -CD'lerle suda çözünen kompleksi oluşturularak steroidal injeksiyonluk formülasyonu hazırlanmış (95) ve fenitoinin de HP- $\beta$ -CD ile hazırlanan parenteral formülasyonu ile doku iritasyonunun azaltıldığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (126).

Siklodekstrinler ile göze ilaç taşınmasına rhEGF:HP- $\beta$ -CD kompleksinden hareketle hazırlanan poloksamer jeller örnek olarak verilebilir. 2-HP- $\beta$ -CD ve SBE- $\beta$ -CD'ler gibi hidrofilik siklodekstrinler pilokarpin göz damlalarında (88) kullanılarak etkin maddenin oküler absorpsiyonunu ve gözde kalış süresini artırdığı, oküler iritasyonu azalttığı gösterilmiştir.

Siklodekstrinler ile yapılan bir diğer çalışmada, metil ve hidroksipropil gibi hidrofilik siklodekstrinlerin lipofilik ilaçların rektal absorpsiyonunu artırdığı gösterilmiştir (132). Literatürde, DM- $\beta$ -CD ve HP- $\beta$ -CD kullanılarak fluriprofen ve bifenil asetik asitin,  $\alpha$ -CD ile morfinin rektal biyoyararlanımının artırıldığı gösterilmiştir (133).

Siklodekstrinler midede ve ince barsakta hidrolize olmakta ve çok az absorplanmaktadır. Ancak, kalın barsakta kolonik mikrobiyal flora ile küçük

sakkaritlere fermente olarak absorplanmaktadır. Prednizolon: $\alpha$ -CD ve triamsinolon asetonid: $\beta$ -CD kompleksleri siklodekstrinlerin kolona ilaç taşınması amacıyla yapılan çalışmalara örnek olarak verilebilir (136).

Bodor ve arkadaşlarının (137) geliştirdiği taşıyıcı sistem ile; steroid, antitümör ilaç, kalsiyum kanal antagonisti gibi molekülleri, 1-metil-1,4-dihidronikotinik asit ile enzimatik olarak bağlayıp lipofilik hale getirmek ve beyine hedeflemek amaçlanmıştır, ancak, moleküllere kazandırılan bu lipofilik özellik ilaçların suda çözünürlüğünü azaltmaktadır. Bu nedenle, HP- $\beta$ -CD kullanılarak, ilaçların çözünürlüğü ve dihidronikotinik asitin sulu çözeltideki kimyasal stabilitesi artırılmaya çalışılmıştır. Brewster ve Loftsson yaptıkları çalışmada, kimyasal modifikasyonun özellikle HP- $\beta$ -CD gibi suda çözünen siklodekstrin türevlerinin beyine taşınmasında önemli olduğunu göstermişlerdir (83).

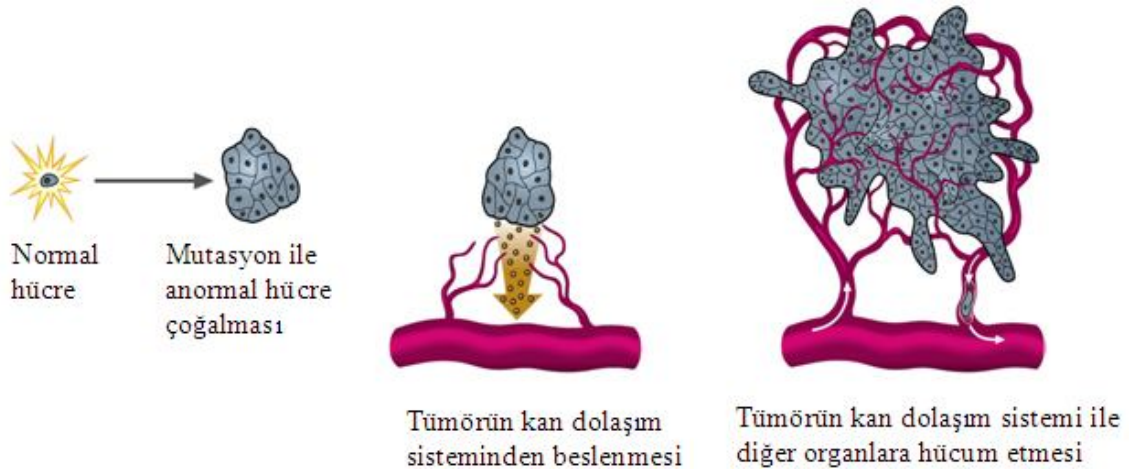
Kan beyin engeli aşılması zor bir bariyer olduğundan peptitlerin absorpsiyonu mümkün değildir. Ancak P-gp sızıntı fonksiyonunu inhibe etmesi sayesinde DM- $\beta$ -CD gibi siklodekstrinlerle bu yapıların beyine taşınması mümkün kılınmıştır (95).

### 2.3. Kanser

Vücudumuzun en küçük yapı taşlarını oluşturan hücreler sonsuz bölünemezler, yaşam süresi boyunca belirli sayıda bölünebilirler. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybederek, kontrolsüz biçimde çoğalmaktadırlar (138). Bir tek hücrenin çoğalmasına neden olan genetik değişikliğin (mutasyon) sonucu tümör oluşmaya başlarken; hücre çoğalmasına bağlı olarak tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyümekte ve bu topluluktaki diğer hücrelerde de mutasyonlar gelişerek tümör ilerlemesi görülmektedir. Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin ancak çok küçük bir kısmı kansere yol açmaktadır. Bunun nedeni mutasyon gösteren hücrelerin yaşama kabiliyetlerinin normal hücrelere göre daha az olması olabilir. Mutasyon gösteren hücrelerin pek çoğunda aşırı büyümeyi önleyen normal kontrol mekanizması bulunmaktadır. Bu yüzden hayatta kalabilen mutant hücrelerin çok azı kanserli hücreye dönüşmektedir (Şekil 2.10). Tümör hücresi pasif difüzyonla beslenerek 2 mm<sup>3</sup> boyutlarına kadar ulaşabilmektedir. Büyümenin devam

etmesiyle, tümör kitlesinin beslenmesini sağlamak için yeni kan damarları oluşumu (anjiojenesis) gelişmektedir (17).

Kanser, hücre mitozunu kontrol eden genlerin mutasyonu veya anormal aktivasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kanser oluşumuna neden olan anormal genlere “onkogen” adı verilmektedir ve yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak 100 farklı onkogen keşfedilmiştir (139).



Şekil 2.10. Kanser oluşumunun şematik olarak gösterilmesi

### 2.3.1. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Nanopartiküller

Bilindiği üzere, nanopartiküllerden etkin maddenin kontrollü salımı, formülasyon parametreleri ile sağlanabilir. Bu amaçla kullanılan polimer veya makromolekül tipi, hazırlama ve yükleme tekniği, ilacın partikül yüzeyine adsorbe olma durumu, ilacın matriste hapsolmesi veya çözünmesi, ilacın makromoleküler yapıyla kompleksleşmesi gibi parametreler dikkate alınarak formülasyonlar geliştirilmektedir (139).

Kanser tedavisinde son yıllarda ilaç taşınması büyük önem taşımaktadır (17, 138,140). Kanser hücreleri normal hücrelere göre kemoterapötik maddelerin etkisine karşı daha duyarlıdır. İlaçlar, hücrelere karşı seçici değildir ve bu nedenle normal dokularda da hasarlara yol açabilmektedir. Kemoterapötik etkin maddelerin normal

hücrelerdeki toksisitesi doza bağlı olarak engellenebilmektedir. Son zamanlarda spesifik hedefleme yapabilecek taşıyıcı sistem yaklaşımları ile kanser hücreleri normal hücrelere göre daha spesifik olarak etkilenmektedir (139). Genellikle, nanopartiküller ile ilaç taşınması aktif ya da pasif hedeflendirme ile yapılmaktadır. Pasif hedeflendirme; tümör kapillerinde sızıntıdan tümör interstisyumuna nanopartikül geçişi, pasif difüzyon veya konveksiyon ile oluşurken, aktif hedeflendirmede, moleküler düzeyde tanınma sağlanarak istenen bir bölgeye ilaç taşınması gerçekleştirilmektedir. Tümöre spesifik hedeflendirme amacıyla; transferrin, antikorlar, folik asit, ısıya hassas polimerler, pH'ya hassas polimerler sıklıkla kullanılmaktadır (139).

Etkin ilaç formülasyonunun geliştirilmesi açısından kanser tedavisinin zorlukları şu şekilde sıralanabilir (138, 139):

- Etkin maddeye ait toksisite ve ciddi yan etkiler
  - Formülasyon faktörleri
    - Çözücüler (örn. Cremophor)
  - Antikanser ilaçların farmakokinetik değişkenlikleri
    - Tedavide aralıklı rejimler ve gerileme dönemleri
    - Seçici olmayan sitotoksosite
    - Geniş dağılıma hacminin sebep olduğu kanser hücrelerinin yanısıra normal hücrelere de sitotoksosite
- Kemoterapinin etkin olmaması
  - İlaç özellikleri
    - Stabilite sorunları (örn. Kamptotesin)
    - Suda çözünürlük sorunları (örn. Paklitaksel)
- İlaç direnci
  - Fizyolojik bariyerlerden dolayı
    - Tümör bölgesinde zayıf damarlanma

- Asidik mikro çevre (microenvironment)
- Yüksek interstisyel basınç ve düşük mikrovasküler basınç
- Hücresel mekanizmalar
  - Spesifik enzim sistemlerinin değişen etkinlikleri
  - Değişen hücre döngüsü/apoptosis düzenlemesi
  - Değişen transport mekanizmaları
    - “*P-gp efflux*” sistemi
- Antikanser ilaçların oral verilmesinin olmaması
  - Düşük oral biyoyararlanım

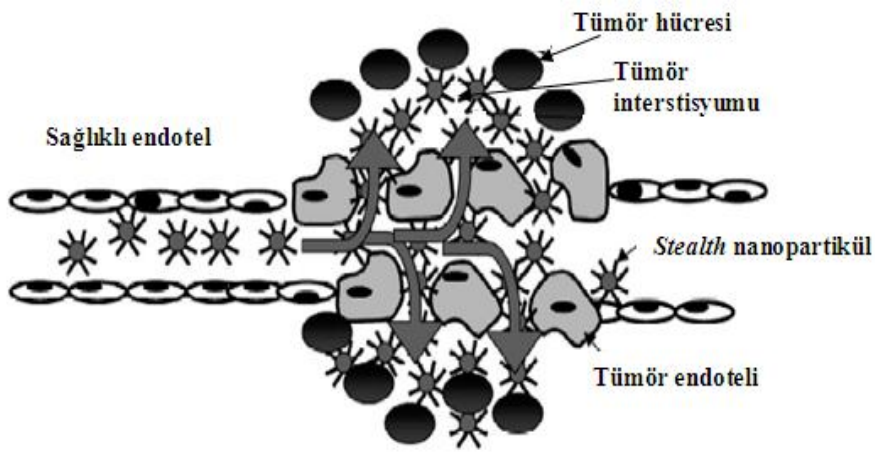
Kanser tedavisinde, nanopartiküler sistemler ile ilaçların kanser hücrelerine karşı olan seçiciliklerini artırmak, dolayısıyla ciddi yan etkileri ve normal dokulara olan toksisiteyi azaltmak, hücresel ve hücresel olmayan direnç mekanizmalarını yenibilmek gibi stratejiler benimsenmektedir (141 - 143).

Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküllerde partikül büyüklüğü önem taşımaktadır. Dolaşımdaki nanopartiküller karaciğer, akciğer, dalak ve kemik iliğinden oluşan retikuloendotelyal sistem (RES) tarafından hızla tanınıp uzaklaştırılmaktadır. Bu dokulara ilaç hedeflendirilmesinin yapılmayacağı durumlarda RES’den kaçabilmek için nanopartiküllerin yüzeyi modifiye edilmelidir. Hepatik metastaz ya da primer hepatokarsinoma gibi durumlarda ise nanopartiküllerin bu sistem tarafından alınması istenmektedir. Bu amaçla, yüzey modifikasyonuna bir örnek pegilasyon işlemidir. Bu teknolojiyle makrofajlar tarafından fark edilmeyen “*stealth*” partiküller hazırlanabilmektedir (144,145).

Artan geçirgenlik ve tutulma etkisi (EPR-Enhanced Permeation and Retention) enjekte edilen partiküllerin tümörün sızdırgan damar yapısı dolayısıyla artan permeasyonu ve lenfatik klirensin yetersizliği sebebi ile partiküllerin artan tutulmasıdır. EPR etkisi, etkin maddenin plazma ve diğer sağlıklı dokulardan çok kanserli dokulara ulaşmasını sağlamaktadır (17). Kanser tedavisinde, tümöre EPR

etkisiyle, RES alımından kaçışla, tümöre özgü olarak, pH'ya ve ısıya bağımlı hedeflendirilmiş nanopartiküller geliştirilebilmektedir (Şekil 2.11).

EPR etkisi ile hedeflendirme, genellikle RES organlarındaki tümörlere hedeflendirme ile sınırlıdır, çünkü i.v. uygulama sonrası konvansiyonel nanopartiküllerin dolaşımında kalma süresi çok kısadır (ortalama yarı ömür: 3-5 dk). Sızdırgan tümör damar yapısından kanserli dokularda terapötik olarak etkin ilaç konsantrasyonunu sağlamak zordur (17).



Şekil 2.11. Dolaşımda uzun süre kalabilen nanopartiküllerin, permeabilitesi artmış damar endotelinden geçerek tümör interstisyumuna ulaşmasının şematik gösterimi

Kanser tedavisinde epitel hücreler arasındaki sıkılaştırılmış kavşaklar, endotel vasküler geçirgenlik, tümör hücrelerinin artan ozmotik basıncı gibi fizyolojik engellerin aşılması konusunda zorluklarla karşılaşılabilir. Tedavinin başarısında kanser öncesi ve neoplastik lezyonların etkin erken teşhisi önemlidir, ayrıca, farklı hedeflendirme stratejilerinin etkin sinerjik kullanımı gerekmektedir (17).

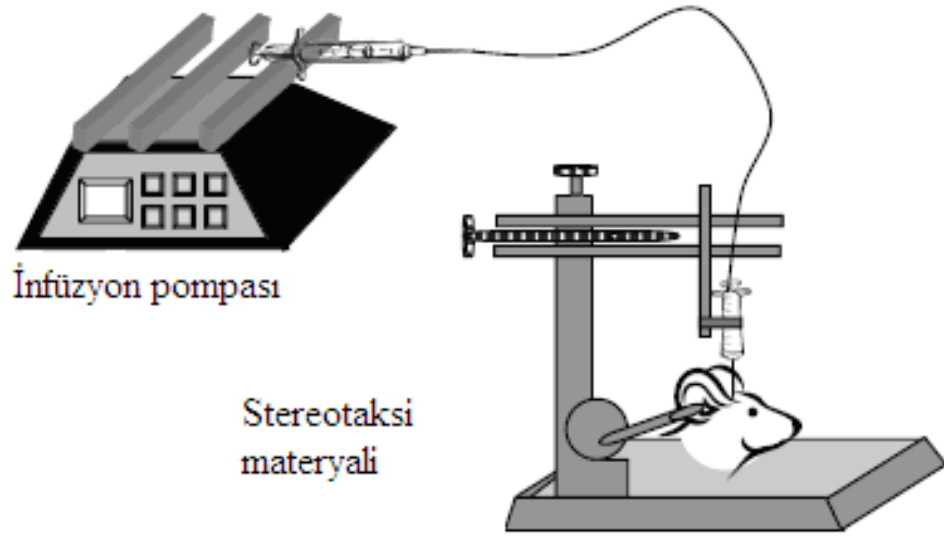
### 2.3.2. Beyin Tümörü ve Stereotaksi Yöntemi İle Tedavi Uygulaması

Primer merkezi sinir sistemi tümörleri 35 yaş altı kişilerde en sık rastlanan ikinci tümördür. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2007'de yapılan bir araştırmada

20.500 yeni beyin tümörü vakasına rastlanırken, 12.740 ölüm olayı ile karşılaşmıştır. Gliomalar, en sık görülen primer beyin tümörlerindedir ve gliomaların tedavisinde kan beyin engelinden dolayı cerrahi işlemlerin yapıldığı doğrudan tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır (146).

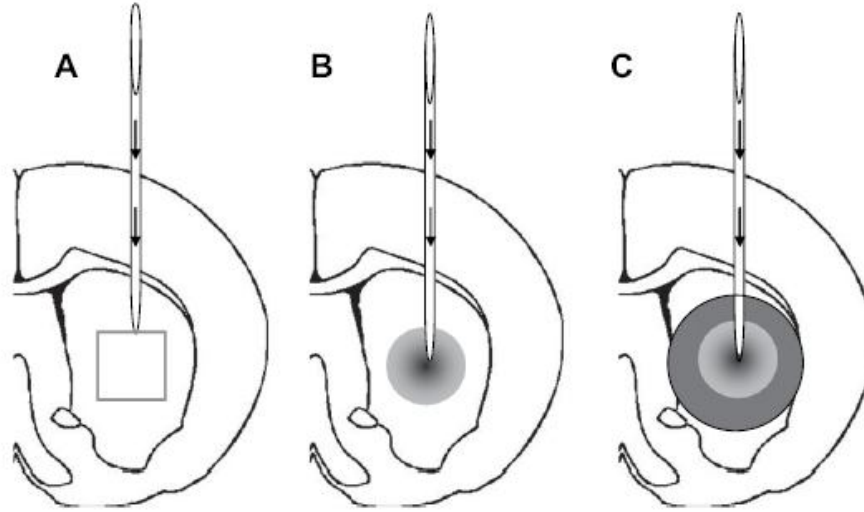
Merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisindeki en önemli problem, etkin maddelerin beyine geçişlerinin sınırlı olmasıdır. Bu sınırlı geçişin nedeni ise beyin kapiller endoteli tarafından oluşturulan kan beyin engelidir. Kan beyin engelinden ilaç geçişini modifiye eden yöntemler cerrahi (nöroşirurjik), farmakolojik ve fizyolojik olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Cerrahi yöntemlerde intraventriküler infüzyon yapılabileceği gibi stereotaksi yöntemi kullanılabilir veya kan beyin engelinin modifikasyonu gerçekleştirilebilir. Farmakolojik yöntemlerde lipidizasyon yani ön-ilaç tasarımı ile ilacın lipofilikliğinin artırılması sağlanabilir ya da lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler kullanılır. Fizyolojik yöntemlerde ise katyonizasyon ve şimerik peptitler kullanılmaktadır (147).

Stereotaksi yöntemi, ya da diğer adıyla konveksiyonla iyileştirilmiş ilaç taşıma yöntemi, kan beyin engelini geçemeyen ilaçların taşınması amacıyla Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (US National Institutes of Health-NIH) tarafından 1990'ların başında tavsiye edilmiştir (Şekil 2. 12). Bu teknik ile kan beyin engeli fiziksel olarak ortadan kaldırıldığı için etkin maddelerin infüzyon bölgesinde yüksek konsantrasyonda bulunması sağlanmakta ve sistemik toksisite de azaltılmış olmaktadır. Bu sayede, etki bölgesindeki ilaç konsantrasyonu sistemik uygulamaya göre önemli ölçüde artırılmaktadır. Stereotaksi tekniği ile beyinin fonksiyonel alanlarına, çevre dokularına zarar vermeden nanopartikül süspansiyonu implante edilebilmektedir. Bu teknik ile implantların açık cerrahi ile zahmetli bir şekilde yerleştirilmesinden kaçınılmış olmaktadır.



Şekil 2.12. Stereotaksi yöntemi ile beyin tümörlerinin tedavi edilmesinin şematik gösterilmesi

Stereotaksi yöntemi, beyin dokularına ilaç taşınmasında tedavi amacıyla kullanılacak olan sıvı dozaj şeklinin pozitif basınç altında sürekli injeksiyonu ile gerçekleştirilmekte ve etkin madde, kateter aracılığıyla şırınga pompası tarafından sürekli olarak verilmektedir. Bu teknikte, difüzyon ve konveksiyon aynı anda meydana gelmektedir. Konveksiyon veya kütle akışı kullanılan bu teknikte stereotaktik injeksiyon ile lokal intraserebral taşınma gerçekleştirilmektedir (Şekil 2. 13). Stereotaksi, beyin içindeki üç boyutlu konumlanmayı gösteren bir tekniktir. Stereotaksi, derinde konumlanmış tümörlere prob, sonda veya yüksek enerjili iyonize radyasyon ışını ile ulaşmada kullanılmaktadır. Etkin maddelerin beyine taşınmasında partikül büyüklüğü kritik parametre olduğundan dolayı lipozomlar, nanopartiküller, dendrimerler ve polimerik miseller bu yöntem ile beyine enjekte edilmektedir (145).



Şekil 2.13. Stereotaksi yönteminin şematik gösterimi (A: Hedef bölgenin spesifik koordinatlarla belirlenmesi ve kateterin yerleştirilmesi, B: Difüzyon, C: Konveksiyon) (145)

## 2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

### 2.4.1. Tanımı ve Kullanım Alanları

Hücre kültürü, spontan migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir. Hücre kültürü günümüzde, hayvan deneylerinin yerine alternatif yöntem olarak kullanılmaktadır (182).

Günümüzde hücre kültürü çalışmaları, çok çeşitli alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kullanım alanları viral aşılar ve viral teşhis amaçlı kullanım; monoklonal antikorlar ile antikor üretimi; interferonların, interlökinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin üretimi; enzim üretimi; somatik gen tedavisi; tümör aşılarda üretimi; canlı hücrelerin “*grafting*” amaçlı kullanımı; kompleks üç boyutlu dokular (yapay deri, kıkırdak, karaciğer, pankreas) olarak sıralanabilir (183,185).

Hücre kültür ortamında, canlı ortama göre fizikokimyasal koşullar (pH, sıcaklık, ozmotik basınç, O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gibi kısmi basınçlar) daha iyi kontrol edilmekte ve homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Doku örnekleri heterojendir, ancak bir veya iki pasaj sonrası homojen hale getirilebilmektedir. Hücre kültürü çalışması yapılarak hayvan deneylerinde karşılaşılan yasal, ahlaki ve etik problemler giderilmektedir. Ekonomik bir yöntemdir. İn vivo şartlarda verilen maddenin % 90'ı atılım veya dokulara dağılım nedeni ile kayıp edilmekte iken, hücre kültüründe bu madde hücreler tarafından doğrudan alındığı için daha az miktarda kullanılmaktadır.

Bu üstünlüklerinin yanı sıra sakıncaları ise şöyle sıralanabilir: Hücre kültürü çalışmaları deneyim gerektirmektedir ve bu çalışmalar aseptik şartlar altında gerçekleştirilmelidir. Uzun zaman alan çalışmalardır. Hücre kültüründe sınırlayıcı faktör, nispeten küçük dokuların üretiminde kullanılan materyal ve harcanan emektir. Kültürde üretilen hücrelerin maliyeti kullanılan dokunun yaklaşık olarak on katıdır. Çoğu hücre dizisinin stabil olmayan anoploid kromozomal bileşiminden kaynaklanan stabilite problemleri söz konusudur (182, 186).

#### **2.4.2. Hücre Yaşayabilirliğinin Ölçülmesi**

İN vivo ortamda dokudaki ve in vitro ortamda kültür kabındaki total hücre sayısı, hücre büyüme ve hücre ölüm hızı arasında bir dengedir. Hücre canlılık oranlarının tespitinde kullanılan yöntemler:

1. Boyama,
2. Metabolik aktivite tayini,
3. Kırılma indeksi incelemesi

şeklinde özetlenebilir (183, 184, 186-188).

Hücre yaşayabilirliğini tayin etmek için farklı tekniklerden faydalanılmaktadır. Yaşayan ve yaşamayan hücrelerin kantitatif ölçümü için boyama yöntemi kullanılır. Bu yöntemde mikroskopik sayım odası "*haemocytometer*" ve tripan mavisi kullanılır. Bu yöntem basit, ucuz bir yöntemdir. Ayrıca hücre süspansiyonunun çok az bir kısmı ile gerçekleştirilebilir. Eğer hücreler tripan

mavisini alırlarsa hücre zarı bütünlüğünün bozulduğu ve hücrelerin canlı olmadığı tespit edilir.

Canlılığın kaybı laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi yöntemi ile belirlenebilir. Bu yöntemde LDH ölü hücreler tarafından ortama salınır ve bu spektrofotometrik olarak tayin edilir (189).

Yaşayan hücreleri tesbit etmek için metabolik aktivite tayininden yararlanılır. Bu amaçla nötral kırmızı, MTT [3(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] ve MTS [3(4,5-dimetiltiyazol-2il)-5-(3-karboksimetoksifenil)2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum,tuzu] kullanılmaktadır (190, 191).

MTT ve MTS tayini, çoğalma ve sitotoksisite çalışmalarında yaşayan hücre sayısını tespit etmek için kullanılan, enzim aktivitesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir (189).

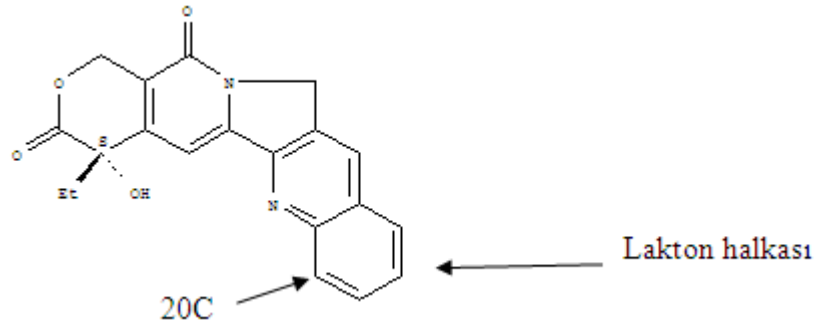
MTT, yaşayan hücrelerin metabolik olarak aktif mitokondrilerinde bulunan dehidrojenazlar (NADH, NADPH) tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucu formazan bileşiğine dönüşmektedir. Formazan oluşumu canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Böylece hücre aktivasyonu, hücresel büyüme ve yaşam ölçülebilmektedir (190,192).

MTS yeni bir tetrazolyum bileşiği olarak ile aynı prensibe sahiptir. Ancak MTS formazon ürünü doku kültür ortamında çözünmektedir. Dolayısı ile bu yöntem MTT'deki yöntemden daha az basamak içermektedir.

## 2.5. Kamptotesin

Kamptotesin (CPT), 1950'li yıllarda, Çin'in güneydoğusunda yetişen *Camptotheca acuminata*, *Nyssaceae* ağacından izole edilmiş ve pentasiklik bir halkası olan indol alkaloididir (Şekil 2.14). Alkali ile muamelede yapı, açık lakton sodyum tuzuna açılmaktadır. Asidifikasyonda, suda çok çözünen sodyum tuzu hızla lakton formuna dönüşmektedir. Kamptotesin suda ve organik bileşiklerin çoğunda çözünmezken dimetilsülfoksitte, metilenklorür:metanol (1:1) karışımında çözünmektedir. Bu nedenle, çoğu biyogeçimli çözücülerle kamptotesinin oral,

intravenöz ve intramuskular yollarla vücuda taşınması zordur. Molekül ağırlığı 345,11 g/mol ve kapalı formülü  $C_{20}H_{16}N_2O_4$ 'dir. Erime derecesi 264-267°C'dir. UV ışığı altında şiddetli mavi floresan vermektedir (148, 149).



Şekil 2.14. Kamptotesinin açık formülü

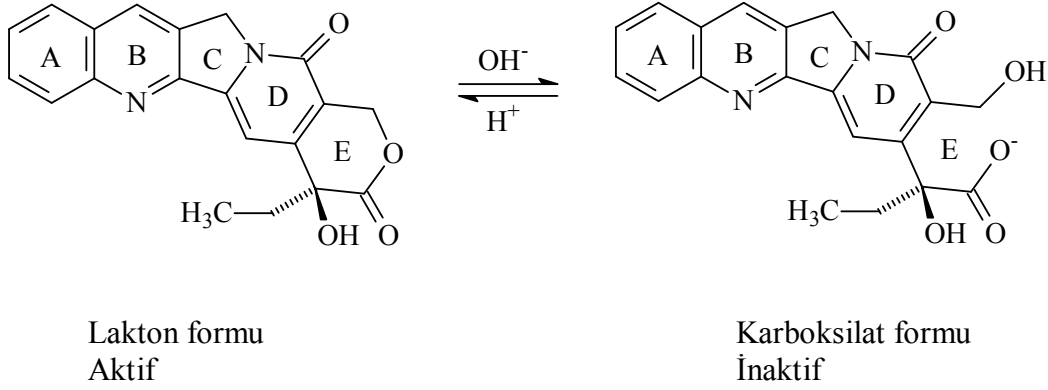
### 2.5.1. Miktar Tayini

Kamptotesinin miktar tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ve spektrofotometrik olarak yapılabilmektedir (150).

### 2.5.2. Stabilitesi

Kamptotesinin yapısındaki 20S kiral karbonun aktivite için önemli olduğu gösterilmiştir. Kamptotesinin biyolojik aktivitesinde lakton halkası önemli bir rol oynamaktadır. Kapalı halka laktonu ve açık halka karboksilik asit formu arasında dinamik bir dengenin olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.15). Kamptotesin pH'ya bağımlı olarak iki formda bulunmaktadır. Aktif lakton formu pH 5'in altında ve inaktif karboksilat formu bazik veya fizyolojik nötral pH'da bulunmaktadır. İn vivo tümör modellerinde de kamptotesinin karboksilat formu, lakton formundan daha az etkili ve erken klinik çalışmalarda daha toksik bulunmuştur. Kamptotesinin laktonu insan plazmasında hızla ve tamamen karboksilat formuna açılmaktadır (151, 152).

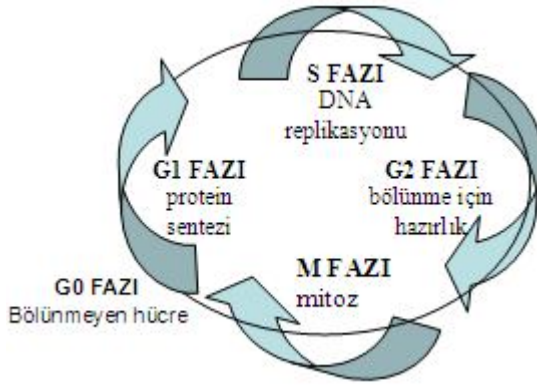
Lakton formu, hücre membranından kolaylıkla difüze olarak topoizomeraz I inhibitör aktivitesi göstermektedir. Lakton formunun, sudaki zayıf çözünürlüğü ve biyolojik pH'daki instabilitesi; karboksilat formunun, düşük biyolojik aktivitesi ve yol açtığı toksisite aktif formun taşınmasını oldukça zorlaştırmaktadır (153, 154).



Şekil 2.15. Kamptotesinin lakton ve karboksilat formlarının şematik gösterimi

### 2.5.3. Farmakolojik Özellikleri

Kamptotesin, hücrel DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda görev alan nükleer enzim Topoizomeraz I'e spesifik olarak bağlanarak etki gösteren yeni sınıf antitümör moleküllerden birisidir. Hücre siklusunu G2 fazda durdurarak ve hücre ölümüne neden olarak etki göstermektedir (Şekil 2.16). DNA Topoizomeraz I enziminin inhibisyonu, yavaş gelişen tümör tiplerinde terapötik etkinlik göstermektedir (155-157).



Şekil 2.16. Hücre siklusunun şematik gösterimi

Kamptotesin kolon, göğüs, ovaryum, akciğer kanseri gibi geniş kanser spektrumunda etkin olan etkili bir antikanser maddedir. İn vitro koşullarda antitümör aktivitesinin saptanmasına rağmen, in vivo kullanımında sorunlarla karşılaşılmıştır. İlacın çözünürlüğünün az olması klinik gelişimine ciddi bir engel oluşturmaktadır (158). Kamptotesinin antitümör etkinliği yanında, HIV-kaynaklı tümörlerde (*Kaposi's sarcoma*) antiviral etkinliği de klinik olarak çalışılmaktadır (159). Parasidik infeksiyonlarda leishmaniasis'e karşı etkisi, kamptotesin enkapsüle edilmiş lipozomlar ile çalışılmıştır. Karaciğer ve dalaktaki makrofajların lipozomları aldığı, bu şekilde ilacın bu bölgede toplanabildiği gösterilmiştir (160). Romatoid artritte kamptotesin ile hazırlanmış sterik stabilize miseler (SSM) taşıyıcı sistemler kullanılmıştır (161).

Kamptotesinin antitümör aktivitesi CA-755 (Adenokarsinoma 755) deneyi ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, farelerde L1210 lökoma hücreleriyle tümör oluşturulmuş, yaşam süresi ve tümör büyümesi inhibisyonu ölçülerek ilacın antikanser etkinliği değerlendirilmiştir (148).

Kamptotesinin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu hızlıdır. Kamptotesin ve analoglarının plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi 2 veya 3 kompartmanlı modele uymaktadır. Lakton formundaki kamptotesinin farmakokinetik özellikleri, karboksilat formundan farklıdır (157).

#### 2.5.4. Kamptotesinin Etki Mekanizması

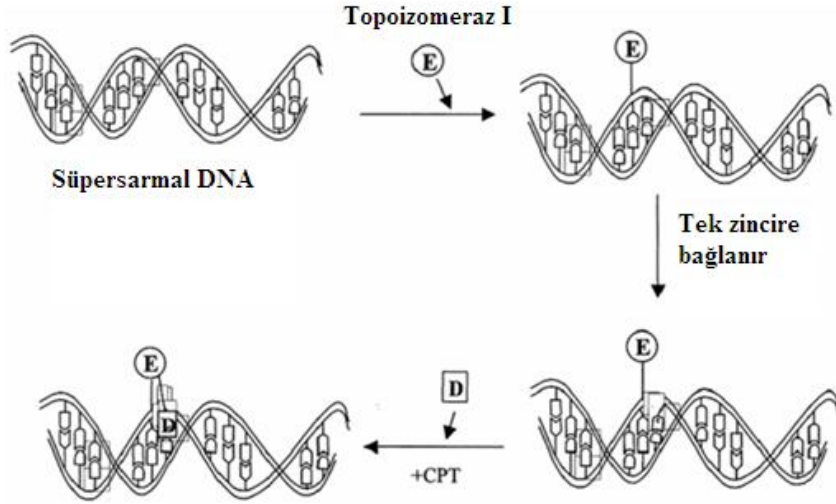
Kamptotesin analogları, DNA topoizomeraz I'yi geri dönüşümlü inhibe eden antikanser ajanlardır (162). 1970'li yıllarda kamptotesinin klinik çalışmalarına kemik iliğine toksik etkisi (*myelosupresyon*), diyare, kanamalı mesane hastalığı (*hemorajik sistitis*) gibi yan etkilerinden dolayı ara verilmiştir. 1980'li yıllarda Topoizomeraz I'in bulunmasıyla tekrar önem kazanmıştır. Kamptotesin, ilk keşfedilen Topoizomeraz I inhibitörüdür. DNA topoizomerazlar, DNA'daki yapısal değişiklikleri düzenleyen (DNA replikasyonu ve transkripsiyonu) en önemli enzimlerdir. Tip 1 DNA topoizomeraz, DNA'nın bir zincirinde geçici kırılmalara neden olurken, tip 2 DNA topoizomeraz çift zincirin geçici kırılmasında rol almaktadır (163-166).

Topoizomeraz enzimleri, ökaryot hücrelerde hücre çekirdeğinde bulunmaktadır. DNA sarmalında geçici kırılmalar meydana getirerek, makromoleküler sentezler boyunca DNA'nın topolojisini kontrol ve modifiye etmektedirler. Transkripsiyon, mitoz bölünme, replikasyon, kromozomların ayrılması/birleşmesi gibi hücre yaşamı boyunca son derece önemli olan fonksiyonlarda rol almaktadırlar (153).

Kamptotesin, memelilerde DNA ve RNA sentezini inhibe ederek sitotoksosite göstermektedir (Şekil 2.17). RNA sentez inhibisyonu, RNA zincirlerinin kısa kalmasına ve hızla geri dönüşümlü ilaç uzaklaştırmasına neden olmaktadır. DNA sentezinin inhibisyonu ise sadece kısmi geri dönüşümlü ilaç uzaklaştırması sağlamaktadır. Kamptotesinin önemli bir etkisi, kültür ortamında DNA'yı hızla ve geri dönüşümlü olarak parçalara ayırmasıdır. Bu topoizomeraz I - DNA bağının stabilitesinin sağlanması, DNA parçalarının oluşturulması ile sağlanmaktadır. Kamptotesin, DNA topoizomerazın kırılma-yeniden birleşme reaksiyonunda yeniden birleşme basamağını bloke etmektedir (148).

Antikanser ilaçlara rezistans çok farklı şekillerde gelişebilir. Bunlardan en önemlisi P-glukoproteine karşı gelişen türüdür. Ancak, kamptotesine karşı uzun dönem kullanımla gelişen böyle bir durum söz konusu olmazken, Topoizomeraz I seviyesinin azalması ile rezistans oluşmaktadır.

Kamptotesin ve türevleri diğer kemoterapötik ajanlarla ve diğer terapötik şekillerle kombine halde kullanılmaktadırlar. Klinik öncesi çalışmalarla radyasyon veya hipertermi gibi ajanlarla kullanıldığı zaman sinerjik antitümör etki gösterdiği saptanmıştır. Topoizomeraz I'in DNA onarımına katılımında kamptotesin radyasyon duyarlaştırıcı olarak rol almaktadır. İn vitro olarak, kamptotesinin radyasyon nedenli sitotoksiteyi artırdığı gösterilmiştir (153).



Şekil 2.17. Kamptotesinin etki mekanizması (153)

### 2.5.5. Kamptotesin İçin Alternatif Formülasyon Yaklaşımları

Kamptotesin için, farmasötik dozaj şekli açısından yeni ve etkin formülasyonlar araştırılmaktadır. Bu amaçla, hedef organla yüksek oranda etkileşme sağlayabilecek, kamptotesinin kimyasal stabilitesini artırabilecek doğal/sentetik hedeflendirici moleküllerle ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır (167).

Lakton formunun sudaki zayıf çözünürlüğü, biyolojik pH'daki instabilitesi, karboksilat formunun düşük biyolojik aktivitesi ve yol açtığı toksisite, aktif formun taşınmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Bu lakton formunun fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanan problemlerin çözümü için, farmasötik dozaj formu açısından yeni formülasyonlar geliştirilmelidir. Literatürde, kamptotesinin poli(laktid-ko-glikolid) mikroküre, poli(etilen glikol)-poli( $\epsilon$ -kaprolakton-ko-laktid)

nanopartikül, solid lipid nanopartikül, lipozom, mikroemülsiyon, nanokristal süspansiyon, miseller çözelti formlarına ilişkin pek çok çalışma görülmektedir (167-180).

### **2.5.6. Kamptotesin Türevleri**

Kamptotesinin irinotekan, topotekan, 9-amino kamptotesin, 9-nitro kamptotesin gibi türevleri hazırlanarak aktivitenin ve stabilitenin artırılması amaçlanmıştır. Bu türevlere ilişkin bilgiler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

#### **2.5.6.1. İrinotekan (CPT-11)**

Suda çözünen kamptotesin türevidir. Karaciğerde karboksilesteraz ve/veya bütirilkolinesteraz ile SN-38'e dönüşen bir ön ilaçtır. SN-38, CPT-11'e kıyasla 1000 kat daha aktiftir ve plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmaktadır. CPT-11'in ve SN-38'in yarılanma ömürleri uzundur (7,9-14,2; 13-13.8 sa). CPT-11 lineer farmakokinetik özellik göstermektedir. Farmakokinetik özellikleri değişkenlik gösterdiğinden farklı dozlama rejimleri uygulanmaktadır. Uygulanan CPT-11'in % 34'ü, SN-38'in % 45-64'ü aktif lakton halinde bulunmaktadır (154).

#### **2.5.6.2. Topotekan**

Suda çözünen yarısentetik kamptotesin türevidir. 9 pozisyonundan yan zincir eklenmesi ile elde edilmiştir. Plazma ömrü en kısa olan türevidir. Bu nedenle ilaç uygulama sıklığı artırılmıştır. 1.5 mg/m<sup>2</sup>/gün dozda 30 dk x 5 gün, 3 haftada 1 uygulanmaktadır. Oral biyoyararlanımı % 32-44'dür. Oral uygulamanın ardından hızla absorplanmakta ve 0.6-0.78 saatte plazma pik konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Kemik iliğine toksik etkisi dozla orantılı olarak gelişmektedir (154).

#### **2.5.6.3. 9-Amino Kamptotesin (9-AC)**

Kanamalı mesane hastalığına neden olmayan sentetik türevidir. Diğer türevlerin aksine suda çözünürlüğünün az olması klinik gelişimine zarar vermiştir. Stabilesi diğer kamptotesinlerden daha azdır. Lewis akciğer karsinomada ve B16

melanomalarda kamptotesinden daha aktif bulunmuştur. Sisplatin ile kombinasyonunda sinerjik etki göstermiştir (154).

#### **2.5.6.4. 9-Nitro Kamptotesin (9-NC)**

9-AC'in ön ilacıdır ve daha stabil türevidir. Oral kullanılmaktadır. Suda çözünmemektedir. Üretimi kolaydır. 5 gün kullanılıp, 2 gün ara verilerek klinik çalışmalarda denenmiştir. Pankreas, ovaryum, meme kanserlerinde kullanılmaktadır. Kemik iliğine toksik etkisi, kanamalı mesane hastalığı gibi yan etkileri vardır (154).

#### **2.5.7. Ticari Preparatları**

Bu bölümde, kamptotesinin ticari preparatları Camptosar<sup>®</sup>, Hycamtin<sup>®</sup> hakkında kısaca bilgi verilecektir.

##### **2.5.7.1. Camptosar<sup>®</sup>**

FDA onaylı irinotekan HCl injeksiyonluk preparatıdır. 5-FU veya lökovorin ile kombine halde kolon veya rektum karsinomasında kullanılmaktadır. 40 mg/2 mL, 100 mg/5 mL ticari formları mevcuttur. 1 mL'de 20 mg irinotekan HCl, 45 mg sorbitol, 0.9 mg laktik asit, pH 3.5 (NaOH/HCl) içermektedir. Tercihen % 5 dekstroz (250-500 mL) veya % 0.9 NaCl ile dilüe edilerek uygulanmaktadır (181).

##### **2.5.7.2. Hycamtin<sup>®</sup>**

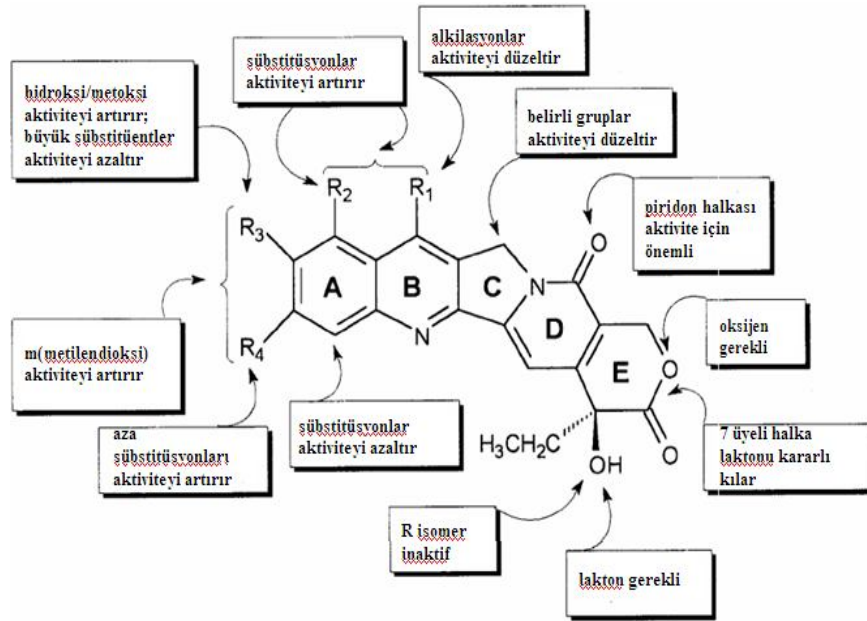
FDA onaylı topotekan HCl injeksiyonluk preparatıdır. Ovaryum karsinomasında ve küçük hücreli akciğer kanserinde kullanılmaktadır. 4 mg topotekan baza ekivalan miktarda HCl tuzu bulunmaktadır. 48 mg mannitol, 20 mg tartarik asit, pH 2.5-3.5 (NaOH/HCl) içermektedir. 4 mg vial 4 mL injeksiyonluk su ile rekonstitüye edildikten sonra % 5 dekstroz veya % 0.9 NaCl ile uygulanmaktadır (181).

### 2.5.8. Kamptotesin Süstitüsyonları

C7, C9, C10 süstitüsyonları topoizomeraz I inhibisyonunu ve çözünlüğü, C12 süstitüsyonu antitümör aktiviteyi, yine C7-C9 ve C10-C11 arasındaki halka süstitüsyonları da aktiviteyi artırmıştır.

Kamptotesin analoglarının sentezi sırasında yapı-aktivite ilişkileri aydınlatılmıştır. Yapı-aktivite ilişkileri Şekil 2.18'de de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (164):

- (i) Topoizomeraz I inhibitör aktivitesi stereospesifiktir. S isomeri, R isomerden çok daha fazla etkilidir.
- (ii) Genel olarak C7, C9 ve C10'a yapılan süstitüsyolar topoizomeraz I inhibisyonunu ve bazen sudaki çözünlüğü artırmaktadır. C12'deki süstitüsyonlar ise antitümör aktiviteyi azaltmaktadır.
- (iii) C7-C9 veya C10-C11 arasındaki halka yapılarının oluşturulması aktiviteyi artırmaktadır.
- (iv) E-halkasında lakton halkasının bulunması bu kimyasal yapı için çok önemlidir. Bu halka sadece antitümör aktiviteden sorumlu değil, aynı zamanda bu yapının stabilitesinin düşük olmasından sorumludur.



Şekil 2.18. Kamptotesinin yapı-aktivite ilişkisi (164)

### 3. DENEYSEL

#### 3.1. Araçlar ve Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

20-S-Kamptotesin	Sigma Aldrich (St. Louis – ABD)
$\beta$ -CDC6 (MA: 2506 g/mol)	Paris Sud Üniversitesi'nde sentezlendi (121) (Farmasötik saflıkta)
6-O-Capro- $\beta$ -CD (MA: 1820 g/mol)	Hacettepe Üniversitesi'nde sentezlendi (118) (Farmasötik saflıkta)
(2-Hidroksipropil)- $\beta$ -siklodekstrin (MA: 1396 g/mol)	Sigma Aldrich (St. Louis – ABD)
Poly- $\epsilon$ -kaprolakton (MA: 14.000 Da)	Sigma Aldrich (St. Louis – ABD)
Poli(laktid-ko-glikolid) (50:50) (MA: 40.000-75.000 Da)	Sigma Aldrich (St. Louis – ABD)
Pluronik F68	ICI Surfactants (Clamart – Fransa)
Aseton	Riedel-de Haen (Seelze – Almanya)
Absolü alkol	Grup Deltalar (Ankara – Turkey)
Tween 80	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn – Almanya)
Glasiyel asetik asit	Merck (Almanya)
Asetonitril	Merck (Almanya)
Hidroklorik asit	Merck (Almanya)
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck (Almanya)
Disodyum hidrojen fosfat	Merck (Almanya)
Sodyum hidroksit	Merck (Almanya)
Hidroklorik asit	Merck (Almanya)
Sodyum klorür	Merck (Almanya)
Potasyum klorür	Merck (Almanya)
Dimetil sülfoksit	Carlo Erba (İtalya)

Trietilamin asetat	Fluka (Almanya)
Metiltiyazoliltetrazolyum (MTT)	Sigma (ABD)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma (ABD)
N,N-Dimetil formamid (DMF)	Sigma (ABD)
% 0,02-0,05 Tripsin/EDTA çözeltisi	Biochrom AG (Almanya)
Kültür flaskları (25 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One (Almanya)
Doku kültür plağı (96 kuyulu)	Costar Corp. (ABD)
Diyaliz membranı	Spectra/Por Cellulose Ester Membrane (MWCO: 100,000 Da, Spectrum Labs, Rancho Dominguez – ABD)
Ultra saf su	Milipore Simplicity 185 (Fransa)
Ketamin	Clorketam <sup>®</sup> , Vetoquinol, Lure, (Fransa)
Ksilazin	Rompun <sup>®</sup> , Bayer, Puteaux (Fransa)

### **Biyolojik Materyal**

Kültür ortamı (L-929 fibroblast hücreleri):	RPMI 1640 (%10 fetal sığır serumu, 2 mM
L-glutamin, 100 ünite/mL Penisilin G ve	100 µg/mL streptomisin ile desteklenmiş, Sigma (ABD)
Fischer F344 dişi sıçanlar	Charles River Laboratuvarları, L'arbresle (Fransa)
Sıçan gliosarkoma 9L hücreleri	European Collection of Cell Culture (Salisbury – İngiltere, N°94110705)
L929 fare fibroblast hücre hattı	ATTC (American Type Tissue Cell Culture Collection – ABD)
MCF-7 insan meme karsinoma hücre hattı	ATTC (American Type Tissue Cell Culture Collection – ABD)

### 3.1.2. Kullanılan Aletler

Çok noktalı manyetik karıştırıcı	Variomag Multipoint HP (Almanya)
Hassas terazi	Sartorius BP 121S (Almanya)
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Mettler-Toledo (Fransa)
Fourier transform infrared spektrometre (FT-IR)	JASCO 420 (Japonya)
Liyofilizatör	Heto Power Dry PL 3000 (Danimarka)
Malvern zetasizer	Zetasizer Nano Series (İngiltere)
Manyetik karıştırıcı	Heidolph (Almanya)
pH metre	Metröhm Herisou pH Metre E 520 – (İsviçre)
Rotavapor	Buchi, R-3000 (İsviçre)
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Jeol SEM-ASID 10 (Japonya)
Termostatlı yatay çalkalayıcı	Nüve (Türkiye)
Ultrasantrifüj	Hermle Z323K (Almanya)
Ultrasonik banyo	Branson B 220 Smith Kline (ABD)
Ultraviyole spektrofotometre	Schimadzu UV-160 A (Japonya)
Ultra saf su cihazı	Milli-Q Systems, Millipore (ABD)
Deiyonize su cihazı	Nano pure Diamond™ Analytical Systems, Barnstead/Thermolyne (ABD)
Q-Scope 350 multimode atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscope-AFM)	Quesant Instrument (ABD)
Hücre sayım cihazı	Coulter Maxm™ Flow Cytometer (ABD)
Mikropipet	Gilson (Fransa)
Etüv (% 5 CO <sub>2</sub> içeren) heraeus CO <sub>2</sub>	Auto zero (Almanya)
Laminar hava akımlı kültür kabini	Cyto Baby CB1204 (Danimarka)
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemi (HP Agilent 1100 Series)	Hewlett Packard (ABD)
• Autosampler (Agilent 1100 Series)	Hewlett Packard (ABD)

• Floresan dedektör (Agilent 1100 Series)	Hewlett Packard (ABD)
• Pompa (Agilent 1100 Series)	Hewlett Packard (ABD)
Kolon	Hichrom, Berkshire 5 RP C18 kolon, 250x4.6 mm (İngiltere)
<sup>1</sup> H NMR Spektrometre	Varian Mercury 400MHz (ABD)
<sup>1</sup> H NMR Spektrometre (in vivo çalışmalar için)	Bruker Avance DRX 300 (Almanya)
32G iğneli (Hamilton®) 10 µL'lik şırınga	Hamilton® cam şırınga 700 seri RN (Fransa)
22G iğneli 100 µL'lik Hamilton® şırıngası	Harvard apareyi, Les Ulis (Fransa)
Stereotaksik deney materyali	Lab Standard Stereotaxic, Stoelting (ABD)
Tüp	Coex™ PE/PVC tübü, Harvard apareyi, Les Ulis (Fransa)
Osmotik pompa	PHD 2,000 infuzyon Harvard apareyi (Fransa)

### **3.1.3. Kamptotesinin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi**

#### **3.1.3.1. Ultraviyole (UV) Spektrumu**

Kamptotesinin dimetilsülfoksitteki 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu  $\lambda=200-400$  nm aralığında çekilmiş ve maksimum absorbansın gözlendiği dalga boyları ( $\lambda_{\max}$ ) tespit edilmiştir.

#### **3.1.3.2. Diferensiyal Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi**

DSC analizi Mettler-Toledo model diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnek, alüminyum örnek kabına yerleştirilmiş ve ısıtma hücresine konmuştur. (-50)-(+350)°C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında, dakikada 10°C sıcaklık artırması uygulanarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1.3.3. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu**

FT-IR Spektrumu, JASCO 420 (Japonya) FT-IR spektroskopisi kullanılarak alınmıştır. 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında % 1 numune içeren potasyum bromür diski kullanılarak çekilmiştir.

#### **3.1.3.4. <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopisi**

Kamptotesine ilişkin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu, DMSO'da çözülerek, Varian Mercury 400 MHz NMR Spektrometre ile alınmıştır. Kimyasal kayma referans değeri olarak tetrametilsilan kullanılarak ( $\delta=0,0$  ppm) ve çözücü sinyalleri (dimetilsülfoksit-DMSO 2,5 ppm ve kloroform-CHCl<sub>3</sub> 7,25 ppm) yardımıyla kalibrasyon yapılarak spektrumlar alınmıştır.

#### **3.1.3.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi**

Hazırlanan nanopartikül örnekleri, metal levhalar üzerine iki taraflı yapışkan bant ile tespit edilmiştir. Bu işlemin ardından, örnek marka kaplama cihazında (BIO-RAD) 100 Å kalınlıkta altın ile kaplanmıştır. Kaplama işlemini takiben örnek SEM (Jeol SEM ASID-10) ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.1.4. Kamptotesinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Miktar Tayini

Kamptotesinin miktar tayini ve kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için 5 mg kamptotesin dimetilsülfoksitte çözülmüş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır. 25-250 ng/mL aralığında 6 farklı konsantrasyondaki kamptotesin çözeltileri, 25, 50, 100, 150, 200, 250 ng/mL olmak üzere PBS (pH 7.4) ile hazırlanmıştır. Lakton formunu elde etmek için pH 3'e, karboksilat formunu elde etmek için pH 10.5'e ayarlanarak HPLC'de analizi yapılmıştır. Mobil faz olarak sulu trietilamin asetat tamponu:asetonitril (73:27) kullanılmıştır (150). Kamptotesinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kamptotesinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar

<b>Kolon:</b>	Hichrom 5, C18, 25 cm X 4.6 mm
<b>Mobil Faz:</b>	Sulu trietilamin asetat tamponu:Asetonitril (73:27)
<b>Enjeksiyon Hacmi:</b>	20 µL
<b>Akış Hızı:</b>	1 mL/dk
<b>Dedektör:</b>	Floresans
<b>Dalga Boyu:</b>	Eksitasyon: 370 nm, Emisyon: 435 nm
<b>Sıcaklık:</b>	Oda sıcaklığı

#### 3.1.4.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Kamptotesinin kalibrasyon doğrusu, dimetilsülfoksit içinde 50 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan ana stok çözeltisinden hareketle uygun konsantrasyondaki çözeltiler hazırlanarak elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) analizi yapılmıştır. Elde edilen 6 kalibrasyon doğrusu üzerinde, regresyon analizleri ve varyasyon analizleri gerçekleştirilmiş, çizilen kalibrasyon doğrusunun ve denklemlerinin eğimleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığı belirlendikten sonra determinasyon katsayısı en yüksek bulunan denklem miktar tayininde kullanılmıştır.

### 3.1.4.2. Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, kullanılacak olan analitik yöntemin doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan işlemdir. Çalışmada kullanılan analitik yöntemin validasyonu için aşağıda sıralanan parametreler incelenmiştir:

- Doğrusallık (linearity)
- Kesinlik (precision)
- Duyarlılık (sensitivity)
- Özgünlük (specificity)
- Stabilitate (stability)

#### 3.1.4.2.1. Doğrusallık

Analitik validasyon için gerekli doğrusallık parametresini göstermek üzere, 50 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan ana stok çözeltisinden hareketle seyreltmeler yapılarak, farklı konsantrasyonlarda kamptotesin içeren 6 adet çözelti hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Farklı günlerde 6 paralel deney yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

#### 3.1.4.2.2. Kesinlik

- **Tekrar Edilebilirlik**

Kalibrasyon çalışmalarında hazırlanan çözeltilerden orta konsantrasyon 100 ng/mL seçilmiş ve bu konsantrasyondaki çözeltinin 6 kez ardı ardına HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizi ile bulunan konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için varyasyon katsayısının % 2'den küçük olması gerekmektedir.

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tekrar elde edilebilirlik parametresinin değerlendirilmesi amacıyla, hazırlanan ana stoktan hareketle seyreltme ile hazırlanan 6 adet 100 ng/mL konsantrasyondaki çözeltilerin HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi ile bulunan konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için varyasyon katsayısının % 2'den küçük olması gerekmektedir.

#### **3.1.4.2.3. Duyarlılık**

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik olarak saptanabilirlik ve tayin edilebilirlik sınırları incelenmiştir. Saptama sınırı, sinyal: gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyondur. Miktar tayini sınırı ise, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikte tayin edilebileceği en düşük konsantrasyon olup bu değer sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu değerdir.

#### **3.1.4.2.4. Özgünlük**

Analitik yöntemin özgünlüğü için, kamptotesinin yanında, hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin çözeltileri hazırlanmış ve aynı şartlarda tek tek HPLC'ye enjekte edilmiştir. Bu maddelerin kamptotesin ile aynı şartlarda pik verip vermedikleri incelenmiştir.

#### **3.1.4.2.5. Stabilite**

Analiz süresince etkin maddenin dayanıklı kaldığından emin olmak için, stabilite testleri yapılmıştır. Kamptotesinin deney süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla 100 ng/mL konsantrasyonlarında çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hazırlanan örnekler hazırlandıkları gün ve 7. gün ve 15. günlerde HPLC'de analiz edilmiştir.

### 3.1.5. Kamptotesinin Hidroliz Kinetiğinin Belirlenmesi

Kamptotesinin DMSO içinde 2 mM çözeltisi hazırlanmıştır. 20 µL çözelti üzerine 2000 µL PBS pH 7.4 konulmuştur ve 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 0., 4., 8. saatlerde ve 1., 2., 5., 7. günlerde kamptotesin miktarı HPLC’de analiz edilmiştir. Bu tez çalışmasında, reaksiyona katılan maddelerin birim zamanındaki değişme hızını gösteren reaksiyon kinetiği hesaplaması, birinci derece reaksiyonlara göre yapılmış ve denklemini aşağıda gösterilmiştir:

$$k_1 = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{[C_0]}{C}$$

$k_1$ : Hız sabiti,

t: Zaman,

$C_0$ : Başlangıç ilaç konsantrasyonu,

C: t zamanındaki ilaç konsantrasyonunu

### 3.1.6. Faz Çözünürlük Çalışmaları

Faz çözünürlük çalışmalarında; kamptotesin miktarı sabit tutularak 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 mmol β-CD varlığında ve % 0, 5, 10, 15, 20, 25 HP-β-CD varlığında çözünürlüğüne bakılmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Bu süspansiyonlar dengeye ulaşana kadar (7 gün) çalkalanmıştır. Daha sonra 0.22 µm membran filtreden süzülerek çözünen aktif kamptotesin miktarı HPLC’de analiz edilmiştir.

### 3.1.7. Kamptotesin:Doğal Siklodekstrin ve Kamptotesin:Amfifilik β-Siklodekstrin İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması

#### 3.1.7.1. Kamptotesin:Doğal Siklodekstrin İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması

1:1 molar oranda CPT:HP-β-CD inklüzyon kompleksi, Hedges ve diğ. (98) tarafından açıklanan kolyofilizasyon tekniğine göre hazırlanmıştır. Bu amaçla tez çalışmalarımızda, 1:1 inklüzyon kompleksinin hazırlanması için 7 mg kamptotesin ve 22.9 mg HP-β-CD 50 mL suda çözülmüştür. Sistem, dengeye gelmesi için 1 hafta boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmış (550 rpm) daha sonra 0.22 µm membran filtreden süzülerek sulu dispersiyon liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonrasında toz halde elde edilen numune, kullanım anına kadar +4°C’de saklanmıştır.

### **3.1.7.2. Kamptotesin:Amfifilik $\beta$ -Siklodekstrin İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması**

1:1 molar oranda CPT:amfifilik siklodekstrin ( $\beta$ -CDC6 veya 6-O-Capro- $\beta$ -CD) inküzyon kompleksi, su / etanol sistemi içinde Hedges ve diğ. (98) tarafından açıklanan kolyofilizasyon tekniğine göre hazırlanmıştır. Bu amaçla tez çalışmalarımızda, 1:1 inküzyon kompleksinin hazırlanması için 7 mg kamptotesin ve 36.4 mg 6-O-Capro- $\beta$ -CD ile 7 mg kamptotesin ve 50.12 mg  $\beta$ -CDC6 20 mL absölv alkolde çözülmüştür. Hazırlanmış olan çözeltiler üzerine, 40 mL deiyonize su eklenmiştir. Su / etanol sistemi, dengeye gelmesi için bir hafta boyu oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (550 rpm). Bir hafta sonunda, organik çözücü vakum altında buharlaştırılmış ve sulu dispersiyon liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonrasında toz halde elde edilen numune, kullanım anına kadar +4°C'de saklanmıştır.

### **3.1.8. Hazırlanan Komplekslerin Karakterizasyonu**

#### **3.1.8.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi**

DSC termogramları, Mettler-Toledo (Fransa) aleti kullanılarak alınmıştır. Örnekler, alüminyum örnek kaplarına yerleştirilmiş ve ısıtma hücresine konmuştur. (-50)-(+350)°C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında, dakikada 10°C sıcaklık artışı uygulanarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1.8.2. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu**

FT-IR Spektrumları, JASCO 420 (Japonya) FT-IR spektroskopisi kullanılarak alınmıştır. 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında potasyum bromür ile hazırlanan diskleri kullanılarak çekilmiştir.

#### **3.1.8.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi**

Hazırlanan örnekler, metal levhalar üzerine iki taraflı yapışkan bant ile tespit edilmiştir. Bu işlemin ardından, örnekler marka kaplama cihazında (BIO-RAD) 100 Å kalınlıkta altın ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi takiben, örnekler SEM (Jeol SEM ASID-10) ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

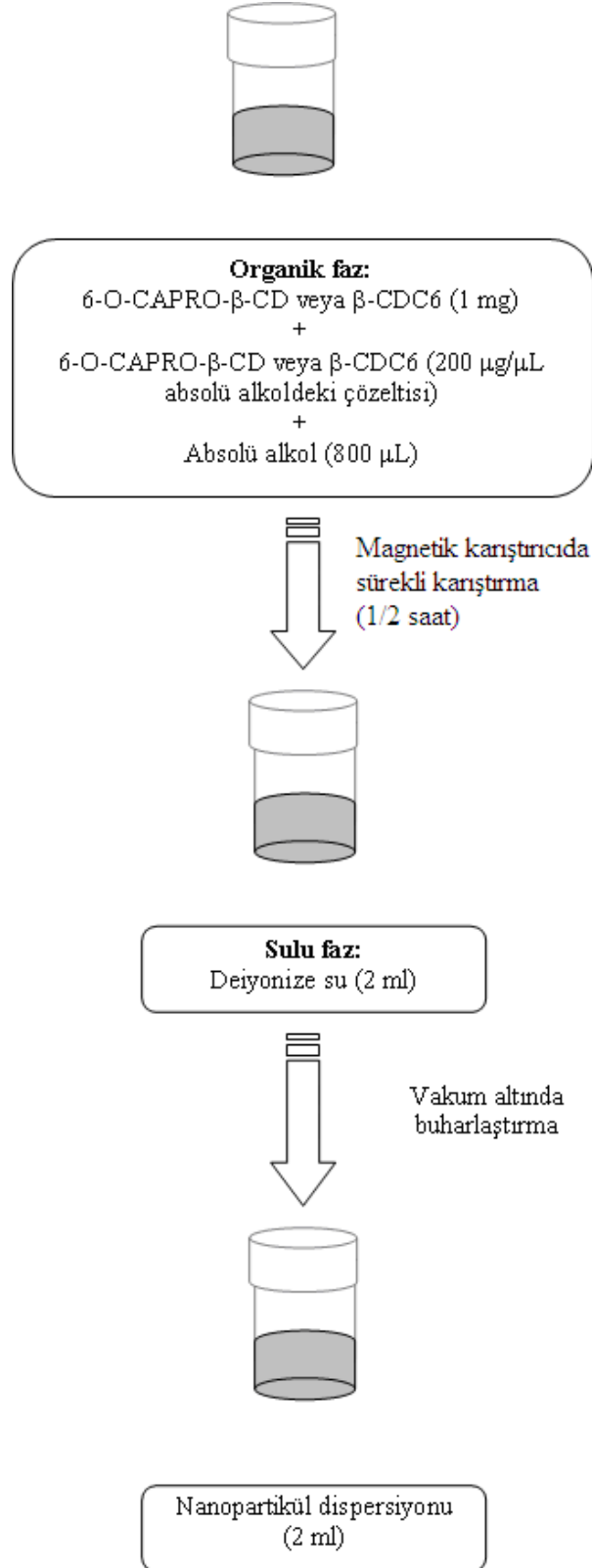
#### 3.1.8.4. <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopisi

Kamptotesine, siklodekstrinlere ve hazırlanan inklüzyon komplekslerine ilişkin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları, DMSO'da çözülerek, Varian Mercury 400 MHz NMR Spektrometre ile alınmıştır. Bu teknik, konuk molekülün kompleks oluşumuna katılan belirli bölümü hakkında da bilgi vermektedir. Kompleks oluşumu sonucu, yeni bir çevrede bulunan siklodekstrin kavitesindeki H-3 ve H-5 protonlarının piklerinde bir kayma gözlenmektedir. Amfifilik siklodekstrin dış yüzeyinde bulunan hidrojenler (H-2, H-4, H-6) kompleksleşmeden etkilenmezler.

#### 3.1.9. Kamptotesin Yüklü Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Hazırlanması

##### 3.1.9.1. Amfifilik $\beta$ -Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kamptotesin içeren nanopartiküller Şekil 3.1'de görüldüğü üzere yüksek yükleme tekniği ile nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanmışlardır (110). 1 mg CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD veya CPT: $\beta$ -CDC6 kompleksi tartılmış ve 800  $\mu$ L absöü alkolde çözüdüürülmüştür. Bu çözültiye kamptotesinin absöü alkoldeki 1 mg/mL çözültisinden 200  $\mu$ L eklenmiştir. Bu organik faz, sabit karıştırma altında (500 rpm) sadece deiyonize sudan oluşun 2 mL sulu faz üzerine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldıktan sonra, organik çözücü rotovaporda uçurularak 2 mL nanopartikül elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanopartiküllerinin nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanması

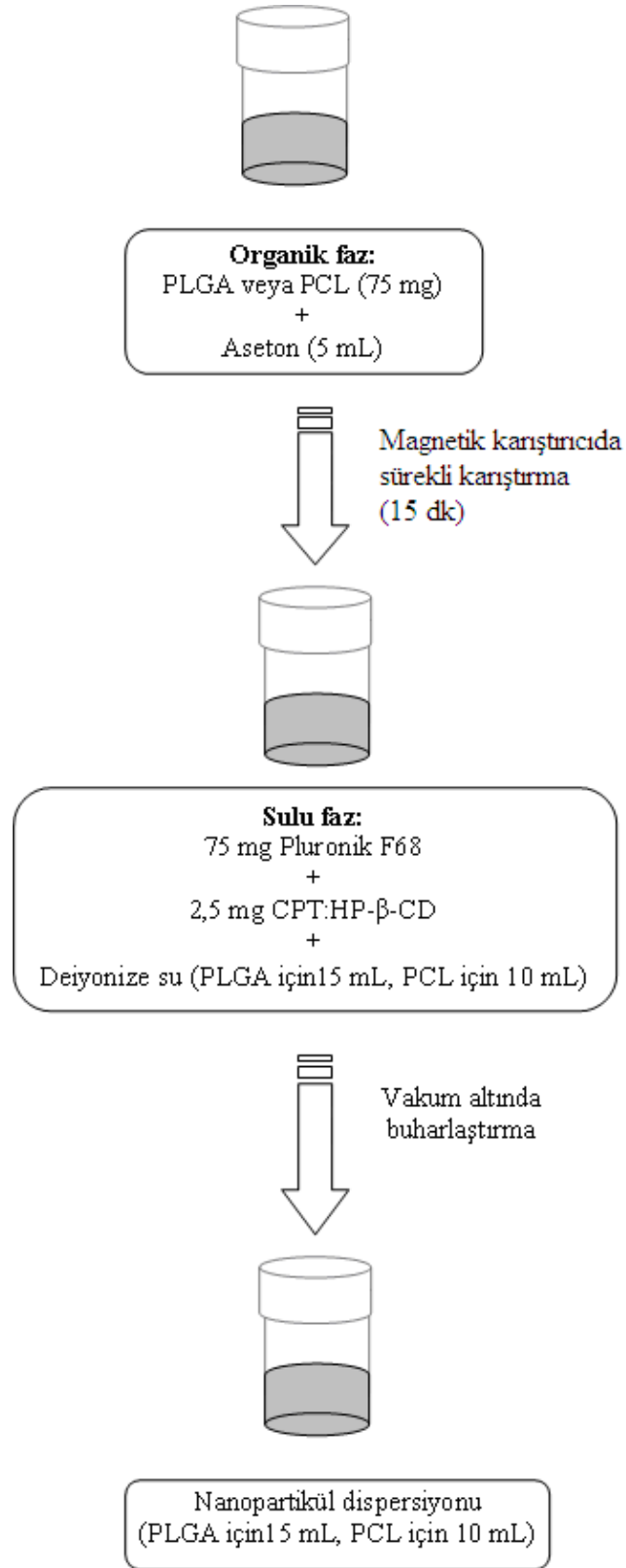
### **3.1.9.2. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması**

#### **3.1.9.2.1. PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması**

Bu tez kapsamında, PLGA nanopartikülleri nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanmışlardır. Bu amaçla, 75 mg Pluronik F68 ve 2.5 mg CPT:HP- $\beta$ -CD kompleksi tartılmış ve 15 mL ultra saf suda çözündürülmüş, 75 mg PLGA ise 5 mL asetonda çözündürülmüştür. Bu organik faz, sabit karıştırma altında (500 rpm) sulu faz üzerine eklenmiştir. Nanopartiküller ortamda kendiliğinden oluşmuştur. Oda sıcaklığında 15 dakika karıştırıldıktan sonra, organik çözücü rotovaporda uçurularak nanopartiküller elde edilmiştir, sonuçta 15 mL nanopartikül süspansiyonu hazırlanmıştır.

#### **3.1.9.2.2. PCL Nanopartiküllerinin Hazırlanması**

Tez çalışmalarımızda, PCL polimeri ile hazırlanan nanopartiküller, nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanmışlardır (Şekil 3.2). Bu amaçla, 75 mg Pluronik F68 ve 2.5 mg CPT:HP- $\beta$ -CD kompleksi tartılmış ve 10 mL ultra saf suda, 75 mg PCL ise 5 mL asetonda çözündürülmüştür. Bu organik faz, sabit karıştırma altında (500 rpm) sulu faz üzerine eklenmiş ve nanopartiküller ortamda kendiliğinden oluşmuştur. Oda sıcaklığında 15 dakika karıştırıldıktan sonra, organik çözücü rotovaporda uçurularak nanopartiküller elde edilmiştir, böylece 10 mL nanopartikül süspansiyonu hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. Polimerik nanopartiküllerin nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanması

### **3.1.9.3. Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

#### **3.1.9.3.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı**

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımları, Brown hareketlerinin ölçümüne dayanan foton korelasyon spektroskopisi yöntemi (173° açı ve 25° sıcaklık) kullanılarak ölçülmüştür (Malvern Zetasizer nano series, Malvern Instruments, İngiltere). Sonuçlar, ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi olarak verilmiştir ( $n=3\pm SS$ ).

#### **3.1.9.3.2. Zeta Potansiyel Ölçümü**

Hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer nano series (Malvern Instruments, İngiltere) aleti ile (12° açı ve 25° sıcaklık) gerçekleştirilmiştir ( $n=3\pm SS$ ).

#### **3.1.9.3.3. Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi**

##### ***Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi***

Hazırlanan örnekler, metal levhalar üzerine iki taraflı yapışkan bant ile tespit edilmiştir. Bu işlemin ardından, örnekler marka kaplama cihazında (BIO-RAD) 100 Å kalınlıkta altın ile kaplanmıştır. Kaplama işlemini takiben örnekler SEM (Jeol SEM ASID-10) ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

##### ***Atomik Güç Mikroskop (AFM) Analizi***

Atomik güç mikroskobu, nanopartiküllerin yüzey karakteristiklerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Nanopartiküller Q-Scope™ 350 Multimode Atomik Güç Mikroskobu-AFM (Quesant-USA) aleti ile görüntülenmiştir. Nanopartikül örnekleri iki taraflı yapışkan bant ile tespit edilerek görüntüleri alınmıştır.

### 3.1.9.4. İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan nanopartiküller 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant dondurulup liyofilize edilmiştir. Elde edilen liyofilizat, 2 mL DMSO içinde çözündürüldükten sonra HPLC'de analiz edilmiştir.

Hapsolan ilaç miktarı; santrifüj işleminden sonra bağlanmayan serbest ilacın ayrılmasıyla, nanopartikül dispersiyonu içerisinde saptanan total ilaç miktarı ( $\mu\text{g}$ )'dır. Asosiye ilaç yüzdesi (%) ve hapsolma etkinliği ( $\mu\text{g}$  ilaç / mg siklodekstrin) değerleri, hapsolan ilaç miktarından hareketle aşağıda belirtilen eşitlikler yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\text{Hapsolma etkinliği} = \frac{\text{Tayin edilen ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Başlangıçtaki CD miktarı } (\mu\text{g})} \times 100$$

$$\text{Asosiye ilaç yüzdesi} = \frac{\text{Hapsolan ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Başlangıçtaki ilaç miktarı } (\mu\text{g})} \times 100$$

### 3.1.9.5. Nanopartiküllerden Kamptotesinin İn Vitro Salımı

Bu tez çalışmasında, nanopartiküllerden in vitro şartlarda kamptotesin salım deneyi diyaliz membran yöntemi kullanılarak yapılmıştır (6). Hazırlanan nanopartiküller diyaliz membranlarına (Spectra/Por Cellulose Ester Membrane MWCO: 100.000 Da, Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA) yerleştirilmiş, 100 mL PBS pH 7.4 çözünme ortamına konulmuştur. Örnekler, sıcaklığı  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulan yatay çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmiş ve yatay çalkalayıcı hızı 50 cpm olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirli zaman aralıklarında 2 mL örnek alınarak, eşit hacimde ve sıcaklıkta taze salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan örnekler HPLC'de analiz edilmiştir.

### 3.1.9.6. L-929 Fare Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksosite Testi

L-929 fibroblast hücrelerine karşı sitotoksosite MTT (metil-tiyazol-tetrazolyum) yöntemi ile incelenmiştir. MTT testi, in vitro ilaç duyarlılığını tayin etmek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, dolaylı olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan ve kısa süreli hücre kültürü esasına dayanan (etkin maddenin salım süresi esas alınarak) bir ilaç duyarlılığı testidir (191).

L-929 fare fibroblast hücre hattı (ATTC), 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskları içinde ısı ile inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 ünite/mL Penisilin G ve 100 µg/mL streptomisin içeren RPMI 1640 sıvı besi yerinde 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde, 2-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bitişik hücre tabakaları tripsinizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla, 500 µL L-929 hücrelerini içeren besiyeri üzerine % 0.02-0.05 Tripsin/EDTA çözeltisi eklenip, 37°C'de 1-2 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, tripsinin FBS etkisi ile inaktif hale geçmesi için tam ortam eklenmiştir. 1800 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj işlemi sonrası, çökelti alınarak ortamın tamamında süspande edilmiştir. L-929 fibroblast hücrelerinin Coulter Maxim cihazında sayımı gerçekleştirilmiş ve mL ortamdaki hücre sayısı saptanmıştır. Sitotoksosite deneylerinde, logaritmik büyüme fazında olan hücreler kullanılmıştır. Bu faz, hücrelerin geometrik artış gösterdikleri fazdır. Bu fazın gelişme oranı ısı, besiyerinin kompozisyonu, hücrenin genetik karakteri ile değişmektedir.

96 kuyulu ve düz tabanlı doku kültür plaklarına (Castor, ABD), 2x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılmıştır. L-929 fibroblast hücreleri, adheran özellikte olduğu için, düz tabanlı plaklar kullanılmıştır. Her bir kuyuya 50 µL hücre süspansiyonu üzerine 50 µL taze hazırlanmış örnekler eklenmiş ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler kültür ortamı ile 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128 olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda dilüe edilmiştir ve her konsantrasyon için 4 kuyu olarak çalışılmıştır. Aynı şartlarda sadece kültür ortamı ile inkübe edilen fibroblast hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol kuyularına, hazırlanan örnekler yerine 50 µL sıvı besiyeri eklenmiştir. 96 kuyulu plaklarda kenar

kuyulardaki buharlaşma etkisi göz önüne alınarak, bu kuyulara hücre ekilmemiş ve 250 µL PBS konulmuştur.

48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, her bir kuyuya 25 µL PBS 7.4 içerisindeki MTT çözeltisi (Sigma) (son konsantrasyon 1 mg/mL) eklenerek 2-4 saat daha inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, canlı olan hücreler tarafından çözünür bir tetrazolyum tuzu olan MTT bileşiği, çözünür olmayan mor renkli formazan kristallerine çevrilmiştir. Oluşan formazan kristalleri ekstraksiyon tamponunda (% 45 DMF içersinde çözülmüş % 23 SDS çözelti-pH=4.7) çözündürülmüştür. Plaklar bir gece inkübatörde (37°C) bırakıldıktan sonra kolorimetrik olarak (Spectramax, USA) 570 nm'de ekstraksiyon tamponuna karşı absorbans değerleri okunmuştur. % Hücre yaşayabilirliği; örneklere ilişkin OD (optik dansite) değerleri, kontrol grubuna ilişkin OD değerlerine bölünerek bulunan değerlerin 100 ile çarpılması sonucu hesaplanmıştır.

### 3.1.9.7. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Etkinlik Testi

MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde antikanser aktivitenin değerlendirilmesinde de MTT (metil-tiyazol-tetrazolyum) yöntemi kullanılmıştır.

MCF-7 meme kanseri hücre hattı (ATTC), 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskları içinde ısı ile inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 ünite/mL Penisilin G ve 100 µg/mL streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi yerinde 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde, 2-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bitişik hücre tabakaları % 0.02-0.05 Tripsin/EDTA çözeltisi ile tripsinizasyon işlemine tabi tutulmuştur ve logaritmik büyüme fazında olan hücreler sitotoksitate deneylerinde kullanılmıştır.

Adheran özellikteki MCF-7 hücreleri, 96 kuyulu ve düz tabanlı doku kültür plaklarına (Castor, ABD), 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. 50 µL hücre süspansiyonu üzerine 50 µL taze hazırlanmış olan örnekler her bir kuyuya eklenmiş ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler için 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128 olmak üzere kültür ortamı ile 5 farklı dilüsyon yapılmıştır ve her konsantrasyon için 4 kuyu olarak çalışılmıştır. Aynı şartlarda kültür ortamı ile inkübe edilen tümör hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır.

48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, her bir kuyuya 25 µL PBS 7.4 içerisindeki MTT çözeltisi (Sigma) (son konsantrasyon 1 mg/mL) eklenerek 2-4 saat daha inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, oluşan formazan kristalleri ekstraksiyon tamponunda (% 45 DMF içerisinde çözülmüş % 23 SDS çözelti-pH=4.7) çözündürülmüştür. Plaklar bir gece inkübatörde (37°C) bırakıldıktan sonra, oluşan renk değişimi kolorimetrik olarak (Spectramax, ABD) 570 nm’de ölçülerek kantitatif olarak MCF-7 hücrelerinin kamptotesin içeren formülasyonlara duyarlılığı değerlendirilmiştir. Kantitatif değerlendirme, % yaşayabilirlik değerleri aşağıdaki eşitlikte belirtildiği şekilde hesaplanarak gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{İlaç yüklü örneklere ait OD değerleri}}{\text{Kontrol grubuna ait OD değerleri}} \times 100$$

### 3.1.9.8. Sıçanlarda Beyin Glioma Modeli<sup>1</sup>

#### 3.1.9.8.1. Kullanılan Hayvanlar ve Anestezi

İn vivo çalışmalar 150-175 g ağırlığında, 10-11 haftalık Fischer F344 dişi sıçanlar (Charles River Laboratuvarları, L’arbrès, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir grupta 8 adet sıçan kullanılmıştır. Sıçanların anestezisi amacıyla 0.75-1.5 mL/kg dozda anestezi çözelti, intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Bu anestezi çözelti karışımı, 2/3 oranda ketamin (100 mg/mL) (Clorketam<sup>®</sup>, Vétoquinol, Lure, Fransa) ve 1/3 oranda ksilazin (20 mg/mL) (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Puteaux, Fransa) içermektedir.

#### 3.1.9.8.2. Hücre Kültürü ve Tümör Hücresinin İmplantasyonu (Tümör Oluşturma Yöntemi)

Sıçan gliosarkoma 9L hücreleri European Collection of Cell Culture (Salisbury, İngiltere, N°94110705)’den temin edilmiştir.

<sup>1</sup> İn vivo çalışmalar, Erasmus Programı çerçevesinde, Fransa Angers Üniversitesi, Inserm U646 Laboratuvarı’nda Prof. Dr. Jean-Pierre Benoit ile yapılan işbirlik sonucu gerçekleştirilmiştir.

Hücreler 37°'de, % 5 CO<sub>2</sub>'de glukoz ve L-glutamin (BioWhittaker, Verviers, Belçika) içeren Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) içinde yaşatılmıştır. DMEM, % 10 fetal calf serum (FCS) ve % 1 antibiyotik, antimikotik çözelti (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Fransa) içermektedir.

Tümör tek tabakası tripsin-etilendiamin tetraasetik asit ile muamele edildikten sonra FCS ve antibiyotik içermeyen EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) ile 2 defa yıkanmıştır. Daha sonra mikroskofta sayım yapılmış ve hesaplanan son hacme 10 µL, 10<sup>3</sup> 9L hücresi olacak şekilde EMEM ile süspande edilmiştir.

İntrakranial implantasyon, 10 µL, 10<sup>3</sup> 9L hücre süspansiyonu dakikada 2 µL olacak şekilde 32G iğneli (Hamilton®) 10 µL'lik şırınga (Hamilton® cam şırınga 700 seri RN) ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, sıçanlar stereotaksik deney materyaline (Lab Standard Stereotaxic, Stoelting, Chicago, IL) yerleştirilmiş (Şekil 3.3), sıçanın derisi açıldıktan sonra kafatasında küçük bir delik oluşturulmuştur. Bu deliğin koordinatları bregmadan 1 mm yukarıda, 3 mm yan tarafında ve 5 mm derinliğinde olacak şekilde ayarlanmıştır. Koordinatlara yerleştirilen iğne dakikada 0.5 mm olacak şekilde yavaşça hareket ettirilmiş ve hücre injeksiyonundan sonra iğneyi çıkarmadan önce 5 dakika bekletilmiştir.



Şekil 3.3. Stereotaksi aletine yerleştirilen sıçanlar

### 3.1.9.8.3. Magnetik Rezonans Görüntüleme

9L hücre injeksiyonundan 5 gün sonra oluşturulan tümörlerin varlığı nükleer magnetik rezonans görüntüleme aleti (Bruker Avance DRX 300, Almanya) ile görüntülenmiştir.

### 3.1.9.8.4. Sıçanlarda Oluşturulan Beyin Tümörünün Nanopartikül Süspansiyonu ile Tedavisi

Oluşturulan tümör, stereotaksi tekniği ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Bu yöntem beyin dokularına ilaç taşınmasında kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Tedavi amacıyla kullanılacak olan sıvı dozaj şeklinin pozitif basınç altında sürekli injeksiyonu ile lokal intraserebral taşınma gerçekleştirilmiştir. Çalışılan laboratuvarın bu yöneme ilişkin hayvan deneyi yapabileceğine dair izninin bulunması nedeniyle, bu çalışma için ayrıca etik kurul izni alınmamıştır.

DeneySEL çalışmanın esasına göre, Bölüm 3.1.9.8.2.'de anlatıldığı şekilde prosedürün uygulanmasını takiben ilk beş günde tümör oluşması beklenmektedir, tümöre tedavi, 6. günde 60 µL nanopartikül süspansiyonu ile başlatılmıştır. İşlem, tümör hücrelerinin injekte edildiği delikten beyin yüzeyinden 5 mm derinliğe 32G iğneli 10 µL'lik Hamilton® şırınga ile uygulanmıştır. Bu (32G iğneli 10 µL'lik) şırınga, ilaç içeren nanopartikül süspansiyonu taşıyan 22G iğneli 100 µL'lik diğer Hamilton® şırıngası (Harvard apareyi, Les Ulis, Fransa) ile bir tüp yardımıyla (Coex™ PE/PVC tübü, Harvard apareyi, Les Ulis, Fransa) birleştirilmiştir. Nanopartikül infüzyonu PHD 2000 infüzyon pompası ile 0.5 µL/dk olacak şekilde 2 saat boyunca sürdürülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Stereotaksi aletine yerleştirilen sıçanların nanopartikül süspansiyonu ile tedavi edilmesi

#### **3.1.9.8.5. Beyin Tümörü Oluşturulan Sıçanların Gözlemi**

Sıçanlar 9L hücre implantasyonunun ilk gününden itibaren günlük aktivitelerinin ve genel durumlarının takibi amacı ile gözlem altına alınmıştır. Altı günde bir ağırlık takipleri yapılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonrasında etrafları ile ilgileri kesilen, kendi kendilerine beslenemeyen, gözleri kızaran ve dışarıdan verilen uyarılara yanıt vermeyen sıçanların yaşamlarına son verilmiştir.

#### **3.1.9.8.6. İstatistiksel Analiz**

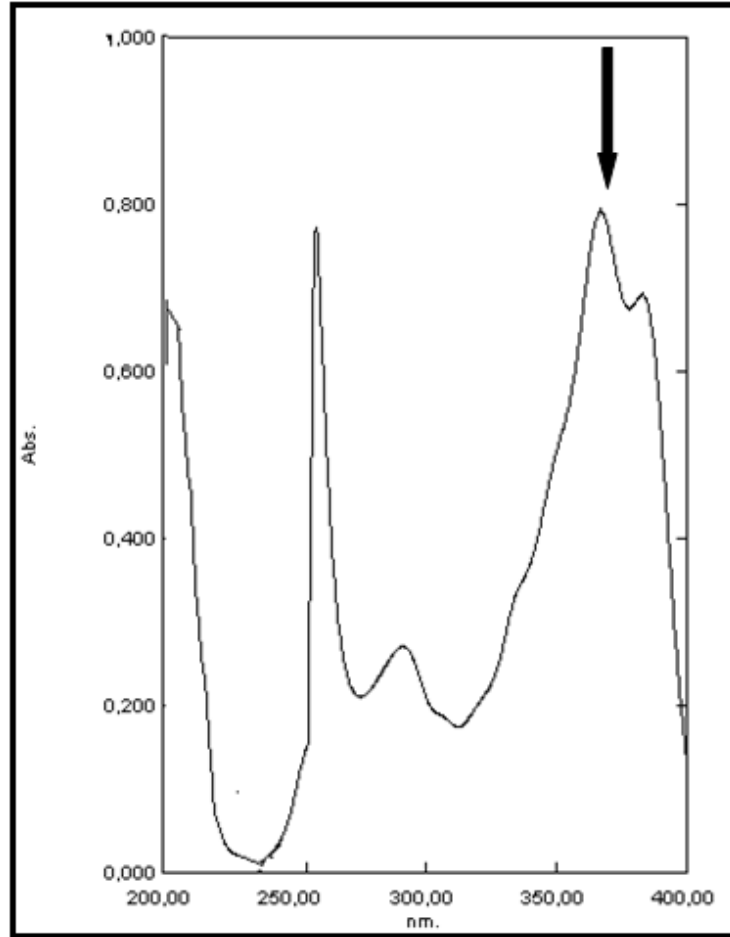
Hayvanların yaşam süreleri Kaplan–Meyer metodu ile değerlendirilmiştir. Kaplan Meyer yöntemi, yaşam sürelerini göstermekte kullanılan bir methodur. Bu yöntemle, tedavi sonrasında deneklerin yaşam süreleri horizontal basamaklarla belirtilmekte ve tedavi edilen grupların yaşam süreleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak yaşam süresinin uzatılıp uzatılmadığı tespit edilmektedir. İstatistiksel fark non parametrik bir test olan log-rank kullanılarak (Mantel-Cox Testi) hesaplanmıştır. Bu amaçla StatView software versiyon 5.0 (SAS Institute) kullanılmıştır. p değerinin 0.05'den küçük çıkması durumu istatistiksel olarak fark olduğu, yani yaşam süresinin uzatıldığı şeklinde değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kamptotesinin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulgular

#### 4.1.1. Ultraviyole (UV) Spektrumu

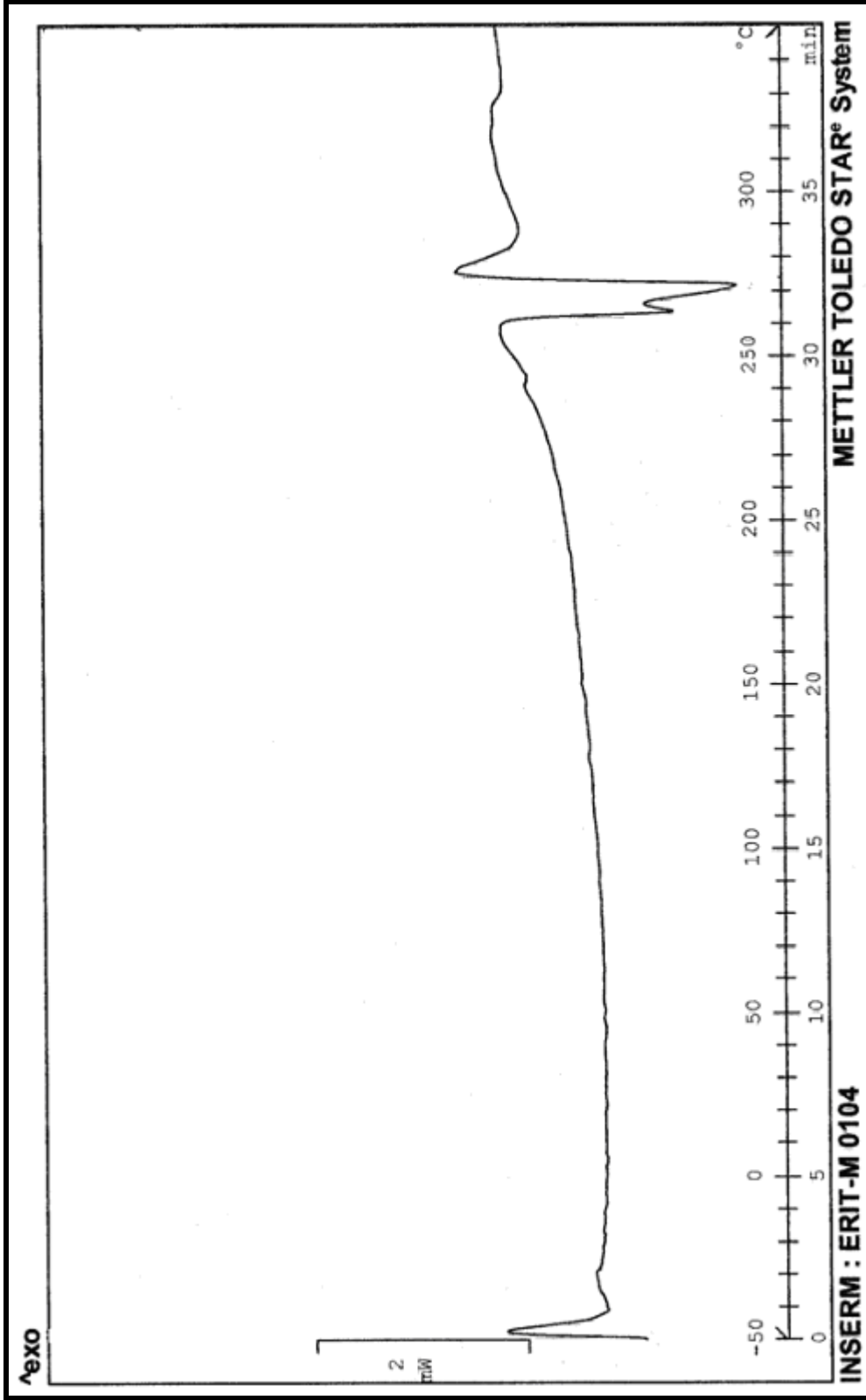
Kamptotesinin, dimetilsülfoksitte hazırlanan 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu Bölüm 3.1.3.1.'de anlatıldığı şekilde alınmıştır. Kamptotesinin maksimum absorbansının gözlemlendiği dalga boyu 370 nm olup UV spektrumu Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu bulgu, kamptotesinin literatürde belirtilen maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ile uyumlu bulunmuştur (150).



Şekil 4.1. Kamptotesinin 200-400 nm dalga boyu arasında çekilen UV spektrumu

#### **4.1.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi**

Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, Bölüm 3.1.3.2.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kamptotesine ilişkin DSC termogramı Şekil 4.2'de verilmiştir. 264-267°C'de elde edilen omuzlu endotermik pik kamptotesinin erime derecesini göstermektedir. Bu bulgu, kamptotesinin literatürde belirtilen erime derecesi ile uyumlu bulunmuştur (155).



Şekil 4.2. Kamptotesine ilişkin DSC termogramı

### 4.1.3. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

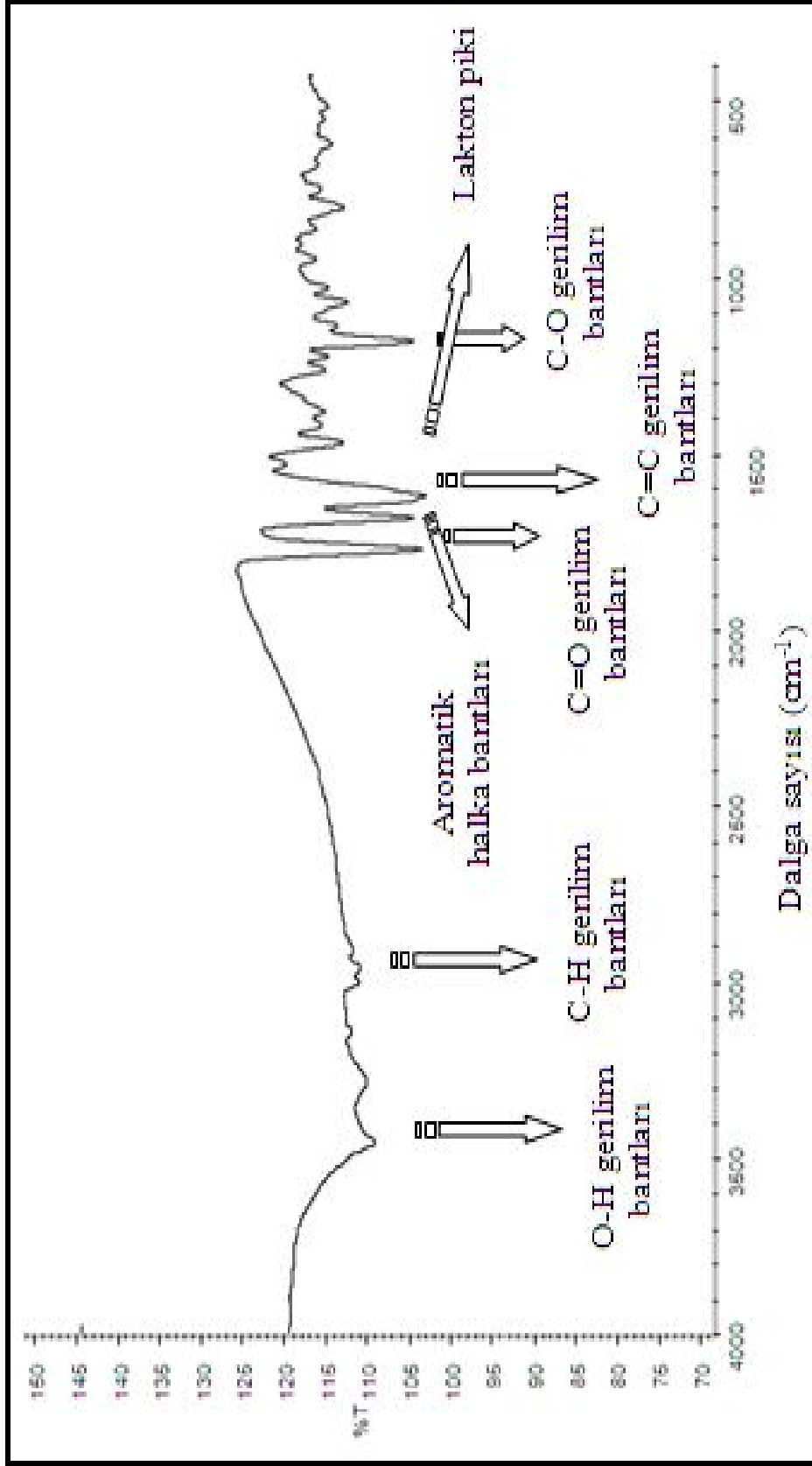
Kamptotesinin FT-IR spektrumu, potasyum bromür ile hazırlanan diskler kullanılarak Bölüm 3.1.3.3’de anlatıldığı şekilde çekilmiş ve spektrumu Şekil 4.3’de gösterilmiştir. FT-IR spektrumunda:

- 3650-2700  $\text{cm}^{-1}$ ’de karboksilik asit grubuna bağlı genişlemiş O-H gerilim bantları,
- 3000-2850  $\text{cm}^{-1}$ ’de alifatik C-H gerilim bantları,
- 1760-1690  $\text{cm}^{-1}$ ’de karbonil grubuna ilişkin karakteristik C=O gerilim bantları,
- 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ ’de aromatik halkaya ilişkin C=C rezonans çifte bağ gerilim bantları,
- 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ ’de ester grubuna ilişkin kuvvetli C-O gerilim bantları,
- 1600–1700  $\text{cm}^{-1}$ ’de yapıya özgü aromatik halka bantları,
- 1760  $\text{cm}^{-1}$ ’de lakton piki

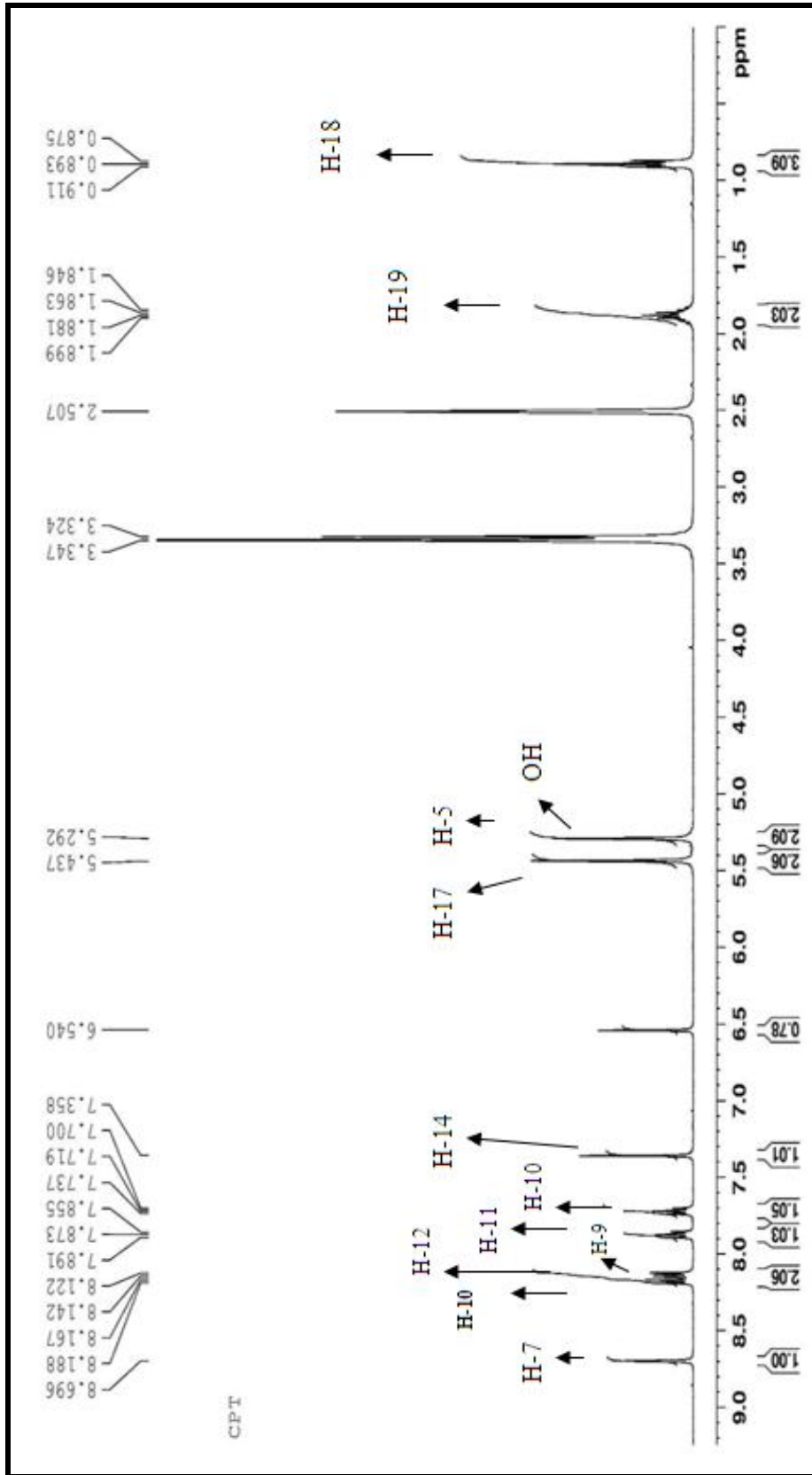
karakteristik madde pikleri olarak görülmektedir. Bu bulgular, kamptotesinin kimyasal yapısı ile uyumlu bulunmuştur (155).

### 4.1.4. $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu

Kamptotesin molekülünün dimetilsülfoksit içerisinde Bölüm 3.1.3.4.’de belirtildiği şekilde 400 MHz’de çekilen  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu Şekil 4.4’de gösterilmektedir.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta\text{H}$ , 400 MHz, DMSO- $d_6$ ) sonuçları şu şekilde verilebilir: 5.292 (H-5), 8.696 (H-7), 8.122 (H-9, dd), 7.700 (H-10, ddd), 7.855 (H-11, ddd), 8.167 (H-12, dd), 7.358 (H-14), 5.437 (H-17), 0.893 (H-18, t), 1.881 (H-19, q), 5.437 (OH). Bu bulgular, literatür bilgileri ile uyumlu bulunmuştur (168).



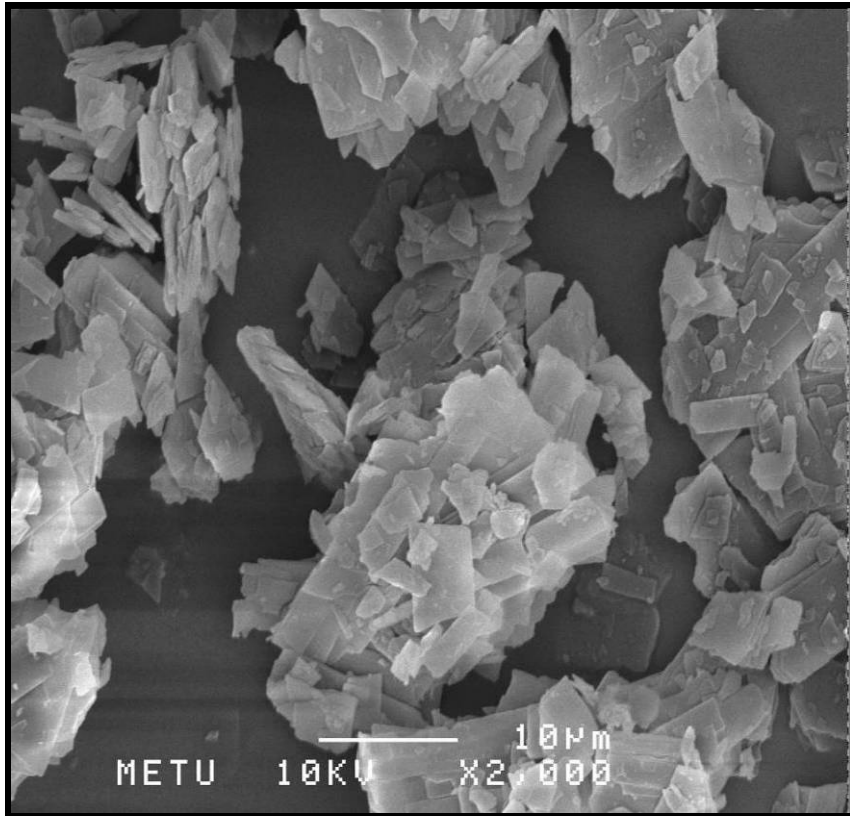
Şekil 4.3. Kamptotesinin FT-IR spektrumu



Şekil 4.4. Kamptotesinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

#### 4.1.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Kamptotesinin yüzey özellikleri, Bölüm 3.1.3.5'te anlatıldığı biçimde SEM ile incelenmiş ve Şekil 4.5'de kamptotesine ilişkin SEM fotoğrafı gösterilmiştir. Molekülün eksenlerinin birbirinden farklı uzunlukta olduğunu görülmüştür. Bu görüntü, monoklonal yapı olarak adlandırılmaktadır.

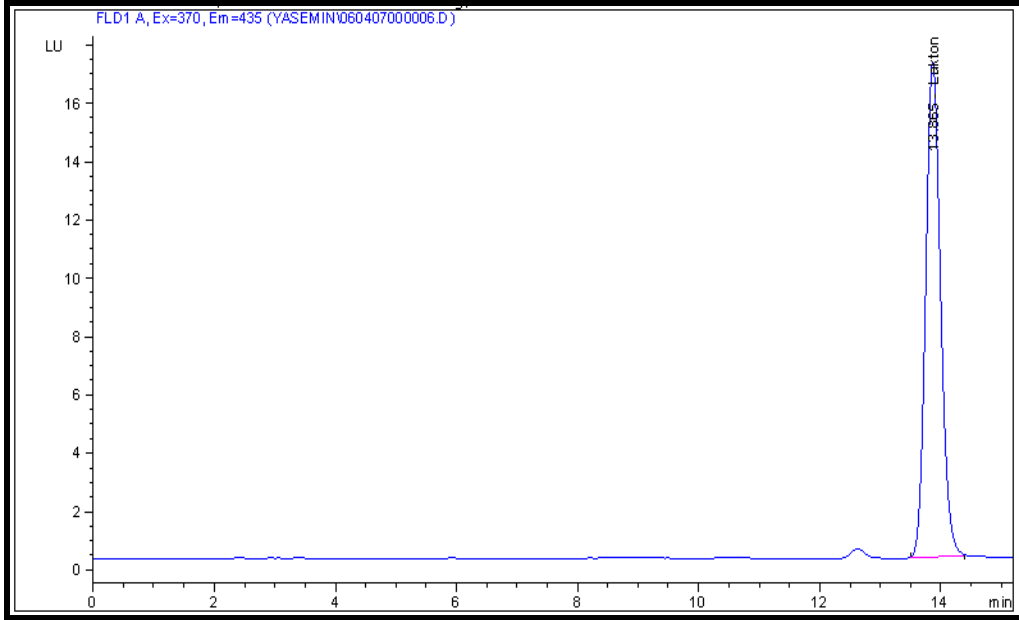


Şekil 4.5. Kamptotesine ilişkin SEM fotoğrafı (X 2000)

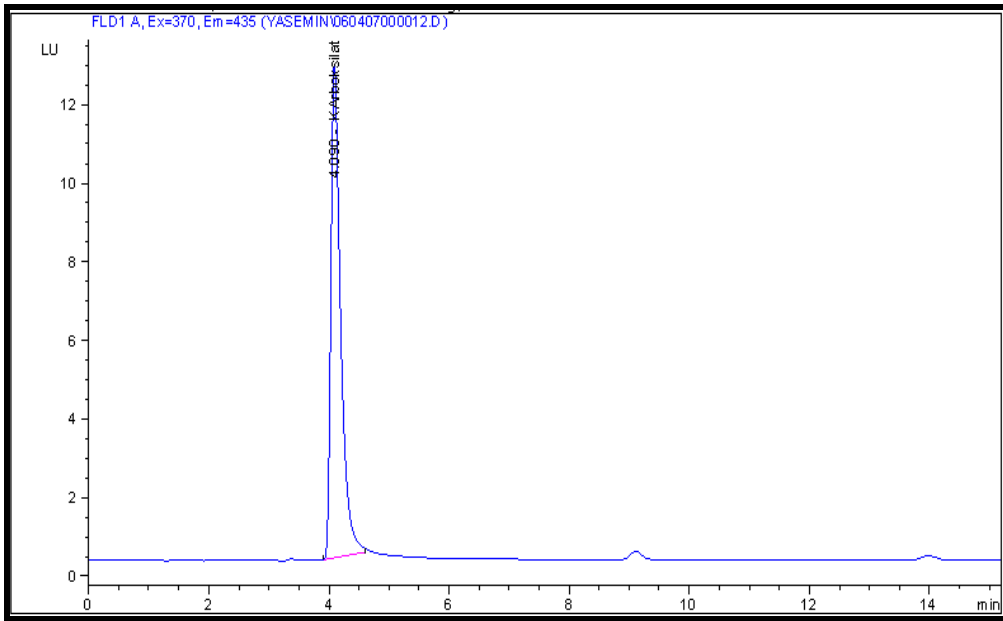
#### 4.1.6. Kamptotesinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Miktar Tayinine İlişkin Bulgular

Kamptotesinin miktar tayini Bölüm 3.1.4.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Kamptotesinin HPLC kromatogramında aktif lakton formuna ilişkin pik 13.8 dakikada gözlenirken, inaktif karboksilat piki 4. dakikada görülmektedir. Aktif

lakton ve inaktif karboksilat formlarına ilişkin pikler ve ilgili kromatogramlar Şekil 4.6 ve 4.7’de verilmiştir. Bu bulgular, kamptotesinin literatürde bildirilen HPLC çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur (150). İn vitro deney sonuçlarında, kamptotesinin stabil kaldığı, elde edilen HPLC pikleri esas alınarak gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Kamptotesinin aktif lakton formuna ilişkin HPLC piki ( $R_t = 13.8$  dk)

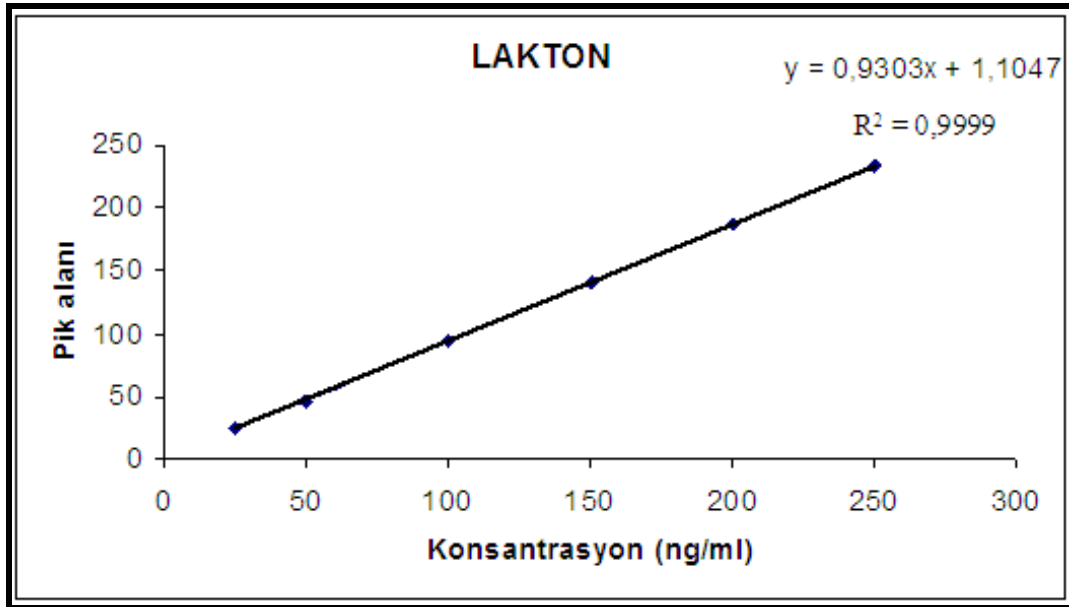


Şekil 4.7. Kamptotesinin inaktif karboksilat formuna ilişkin HPLC piki ( $R_t = 4$  dk)

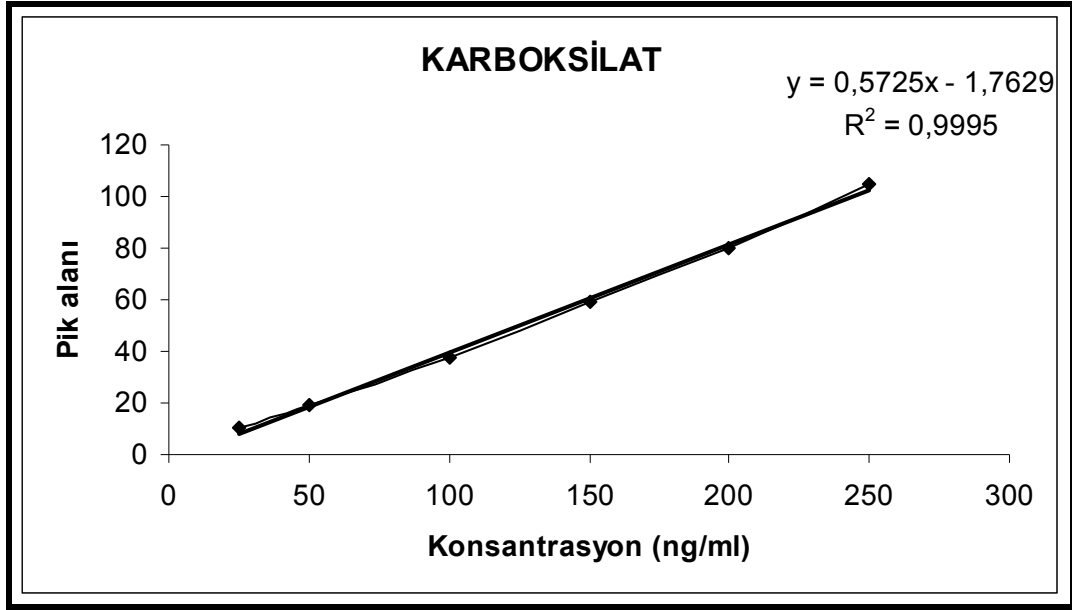
#### 4.1.7. Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonuna İlişkin Bulgular

##### 4.1.7.1. Doğrusallık

Kamptotesinin kalibrasyon doğrusu Bölüm 3.1.4.2.1.'de anlatıldığı gibi elde edilmiştir. Kalibrasyon doğruları Şekil 4.8'de ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonlarına (ng/mL) karşı pik alanları (mAU\*s) grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrularına ilişkin denklemler, lineer regresyon analizi ile bulunmuştur.



Şekil 4.8. Kamptotesinin aktif lakton formunun kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)



Şekil 4.9. Kamptotesinin inaktif karboksilat formunun kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)

#### 4.1.7.2. Kesinlik

##### 4.1.7.2.1. Tekrar Edilebilirlik

Kamptotesinin 100 ng/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltisinin 6 defa ardışık olarak HPLC analizi Bölüm 3.1.4.2.2’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. HPLC analizi ile bulunan lakton ve karboksilat formlarına ilişkin konsantrasyon değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 4.1 ve 4.2). Hesaplanan varyasyon katsayıları lakton formu için % 0.69; karboksilat formu için % 0.65 olarak bulunmuştur. Varyasyon katsayısı her iki form için de % 2’nin altında olduğu için sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içinde bulunmuştur.

Tablo 4.1. Kamptotesinin lakton formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar edilebilirlik sonuçları

<b>Konsantrasyon (ng/mL)</b>	<b>Pik Alanı (mAU*s)</b>
100	126.84
100	126.57
100	126.12
100	125.58
100	124.94
100	124.70
<b>X</b>	125.79
<b>SS</b>	0.87
<b>VK</b>	0.69

Tablo 4.2. Kamptotesinin karboksilat formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar edilebilirlik sonuçları

<b>Konsantrasyon (ng/mL)</b>	<b>Pik Alanı (mAU*s)</b>
100	39.75
100	39.60
100	39.41
100	39.43
100	39.00
100	39.33
<b>X</b>	39.42
<b>SS</b>	0.26
<b>VK</b>	0.65

#### 4.1.7.2.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Kamptotesinin 100 ng/mL konsantrasyonda ayrı ayrı hazırlanan 6 adet çözeltisi için HPLC analizi Bölüm 3.1.4.2.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi ile bulunan konsantrasyon değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır. Hesaplanan varyasyon katsayıları lakton formu için % 1.77; karboksilat formu için % 0.76 olarak bulunmuştur. Varyasyon katsayısı her iki form için de % 2’nin altında olduğu için sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içinde bulunmuştur (Tablo 4.3 ve 4.4).

Tablo 4.3. Kamptotesinin lakton formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

<b>Konsantrasyon (ng/mL)</b>	<b>Pik Alanı (mAU*s)</b>
100	118.36
100	114.37
100	113.72
100	116.67
100	113.06
100	113.44
<b>X</b>	119.13
<b>SS</b>	2.11
<b>VK</b>	1.77

Tablo 4.4. Kamptotesinin karboksilat formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

<b>Konsantrasyon (ng/mL)</b>	<b>Pik Alanı (mAU*s)</b>
100	39.93
100	39.30
100	39.64
100	40.02
100	40.01
100	40.09
<b>X</b>	39.83
<b>SS</b>	0.30
<b>VK</b>	0.76

#### 4.1.7.3. Duyarlılık

Bölüm 3.1.4.2.3'de açıklandığı şekilde yapılan analizler ve değerlendirmeler sonucunda kamptotesinin lakton formu için saptama sınırı 4 ng/mL, tayin sınırı ise, 1 ng/mL; karboksilat formu için saptama sınırı 8 ng/mL, tayin sınırı ise, 3 ng/mL olarak bulunmuştur.

#### 4.1.7.4. Özgünlük

Analitik yöntemin özgünlüğü için, kamptotesinin yanında, hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin ( $\beta$ -CDC6, 6-O-Capro- $\beta$ CD, HP- $\beta$ -CD, PLGA, PCL, Pluronic F68) formülasyonda kullanılan konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve aynı koşullar altında tek tek HPLC analizi Bölüm 3.1.4.2.4'te açıklandığı şekilde yapılmıştır. Formülasyonlara giren yardımcı maddelerin kamptotesinin lakton ve karboksilat formlarıyla aynı zamanda pik vermedikleri gözlenmiştir.

#### 4.1.7.5. Stabilite

Kamptotesinin HPLC analizi süresince dayanıklı kaldığından emin olmak için, stabilite testleri Bölüm 3.1.4.2.5'te açıklandığı şekilde yapılmıştır. Bu amaçla, lakton ve karboksilat formlarının 100 ng/mL konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu örnekler, hazırlandıkları gün, takiben 7. gün ve 15. günlerde HPLC'de analiz edilmiştir. Lakton formu için hesaplanan varyasyon katsayısı % 2'nin altında olduğu için sonuçların kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görülmüştür. Karboksilat formu için ise varyasyon katsayısı % 4.81 bulunmuştur. Bu da 15 gün içinde karboksilat formunun dayanıklı olarak kalmadığını göstermektedir (Tablo 4.5 ve 4.6). Karboksilat formu kamptotesinin aktif olmayan formu olduğu için bu bulgu deney planlaması açısından önemli bulunmamıştır. Bu bulgular ışığı altında yine de kamptotesin tayini için toplanan numuneler salım süresi sonunda hemen analize alınmıştır.

Tablo 4.5. Kamptotesinin lakton formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında stabilite çalışmaları sonuçları

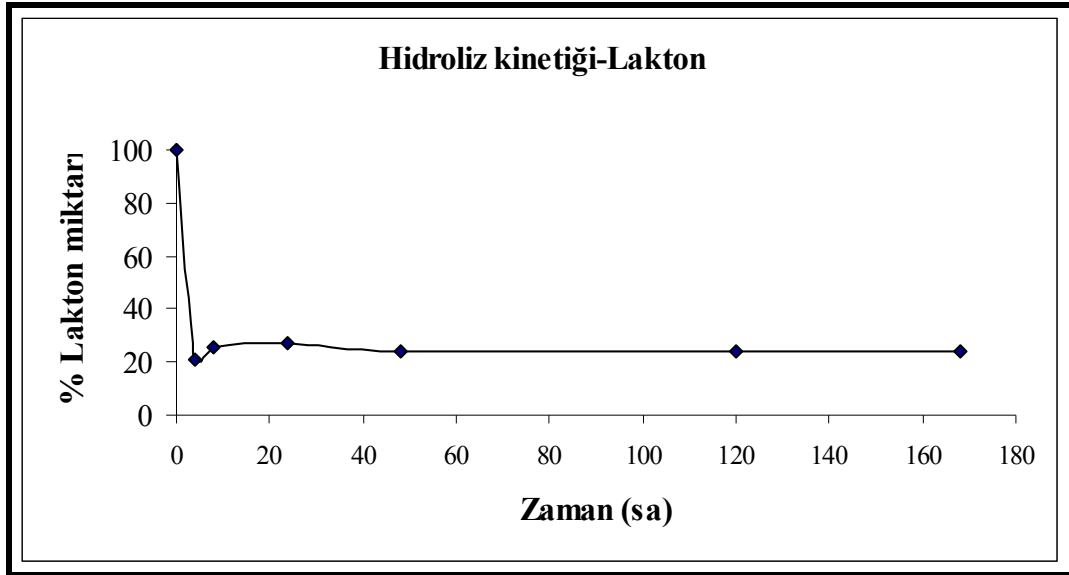
Ölçüm Zamanı (gün)	Pik Alanı (mAU*s)	Konsantrasyon (ng/mL) ( $\pm$ SS)
0	111.18	98 $\pm$ 0.4
7	110.26	97 $\pm$ 0.4
15	110.73	98 $\pm$ 0.4

Tablo 4.6. Kamptotesinin karboksilat formunun miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarında stabilite çalışmaları sonuçları

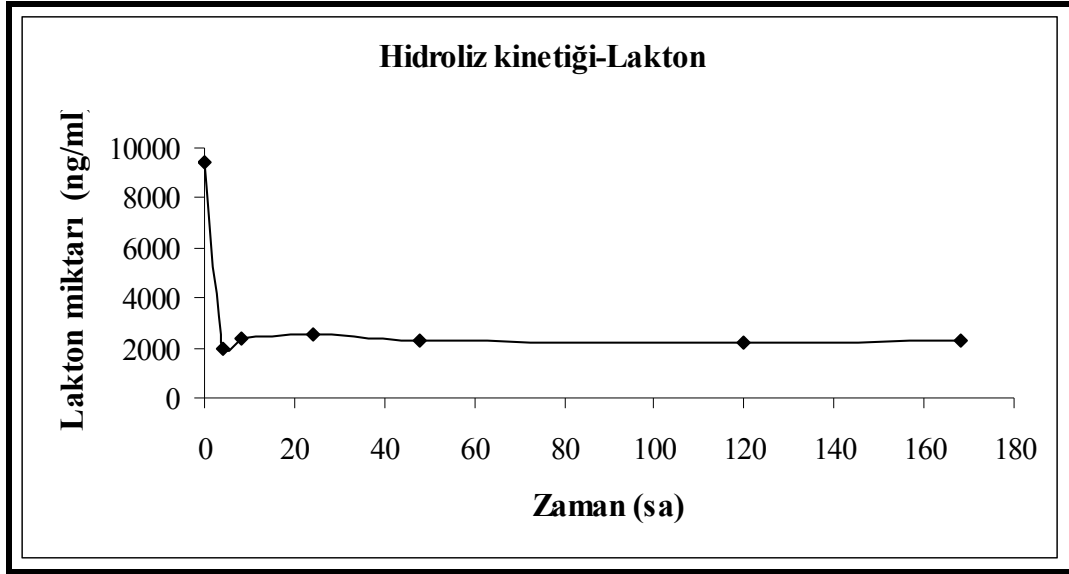
Ölçüm Zamanı (gün)	Pik Alanı (mAU*s)	Konsantrasyon (ng/mL) ( $\pm$ SS)
0	35.94	66 $\pm$ 3.3
7	39.74	72 $\pm$ 3.3
15	37.63	69 $\pm$ 3.3

#### 4.1.8. Kamptotesinin Hidroliz Kinetiğinin Belirlenmesi

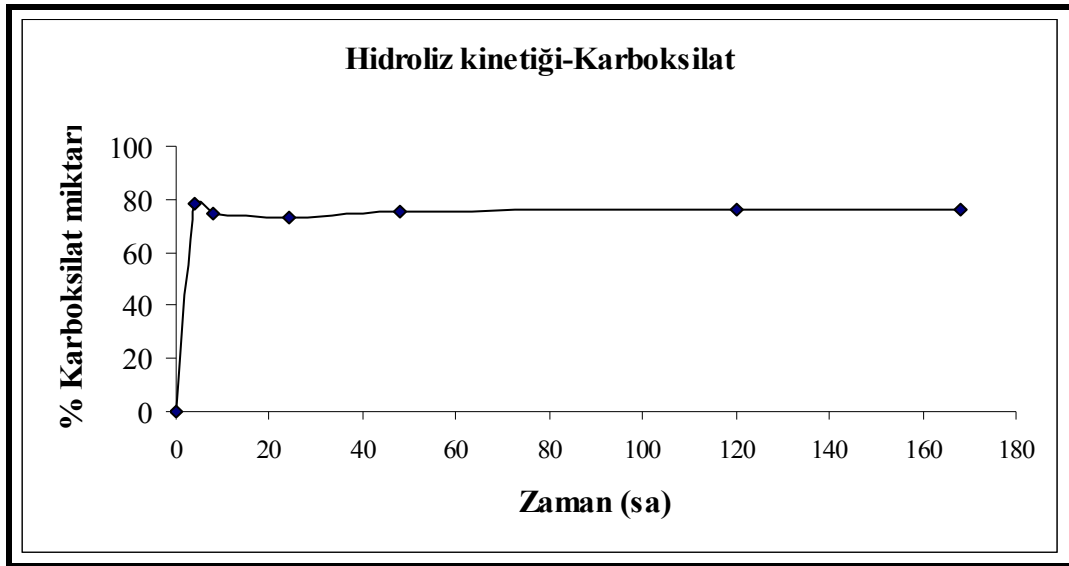
Kamptotesinin hidroliz kinetiği çalışması Bölüm 3.1.5.'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Kamptotesinin lakton formuna ilişkin HPLC analiz bulguları ve profilleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de, karboksilat formuna ilişkin bulgular ve profilleri ise Şekil 4.12. ve Şekil 4.13'de verilmiştir. Kamptotesinin PBS pH 7.4 içindeki lakton miktarının 4. saat sonunda % 20'lere kadar düştüğü saptanmıştır. Bu bulgular, kamptotesinin aktif lakton formunun fizyolojik pH'da hızla inaktif karboksilat formuna dönüştüğünü göstermekte olup bulgular literatür ile uyumlu bulunmuştur (151, 152).



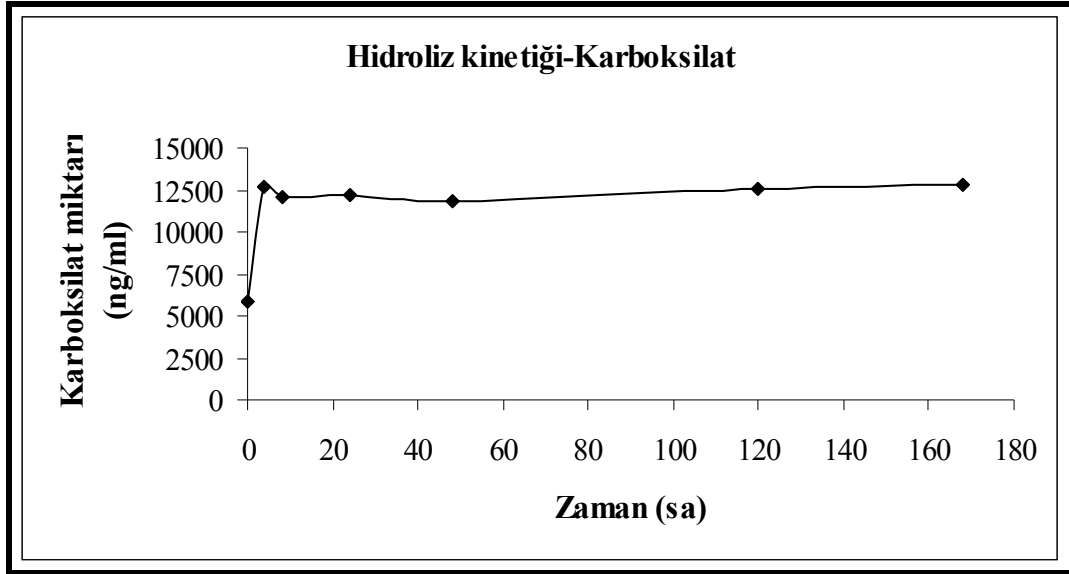
Şekil 4.10. Kamptotesinin lakton formunun pH 7.4'te zamana karşı % miktarı (n=3±SS)



Şekil 4.11. Kamptotesinin lakton formuna ilişkin hidroliz kinetiği profili (n=3±SS)



Şekil 4.12. Kamptotesinin karboksilat formunun pH 7.4'te zamana karşı % miktarı (n=3±SS)



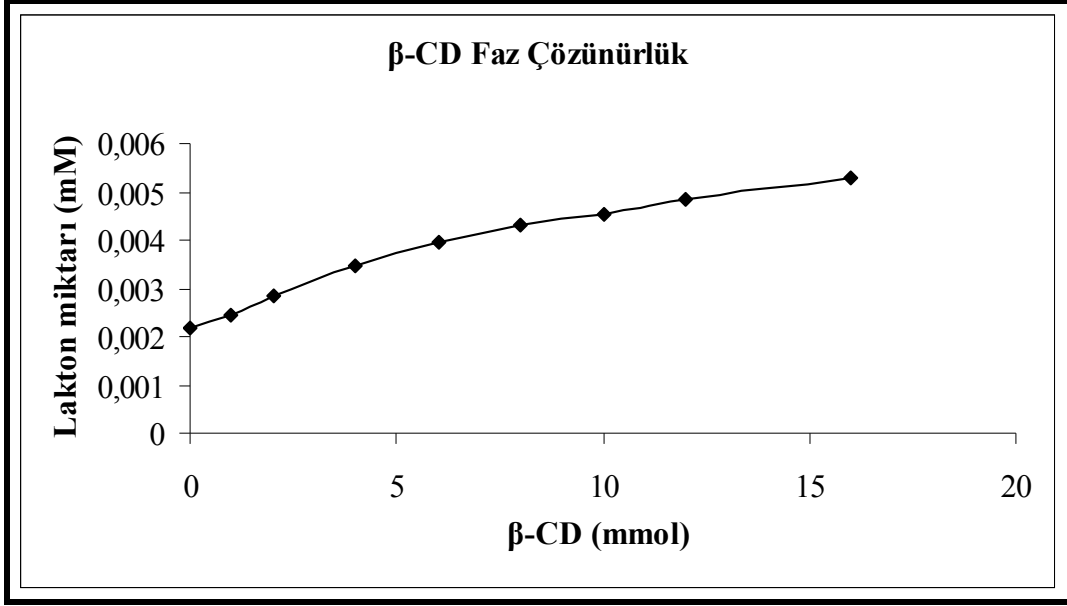
Şekil 4.13. Kamptotesinin karboksilat formuna ilişkin hidroliz kinetiği profili (n=3±SS)

#### 4.1.9. Faz Çözünürlük Çalışmaları

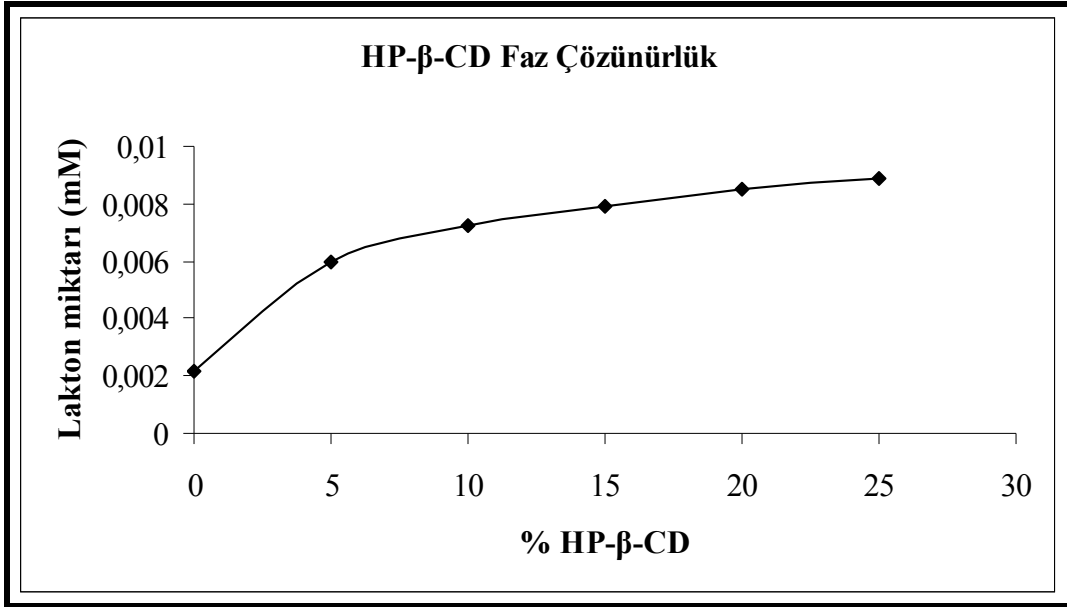
Faz çözünürlük çalışmaları Bölüm 3.1.6.'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve  $K_{1:1}$  değeri Bölüm 2.2'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır.  $\beta$ -CD ve HP- $\beta$ -CD için faz çözünürlük diyagramları sırasıyla Şekil 4.14.'de ve Şekil 4.15.'de gösterilmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kamptotesinin HP- $\beta$ -CD için  $K_{1:1}$  değeri  $233.75 M^{-1}$  iken  $\beta$ -CD için  $K_{1:1}$  değeri  $138.89 M^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer büyük olması etkin maddenin siklodekstrine afinitesinin ve oluşturulan ilaç:siklodekstrin kompleksinin stabilitesinin yüksek olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kamptotesinin HP- $\beta$ -CD'e olan afinitesi daha yüksek çıkmıştır. HP- $\beta$ -CD ve  $\beta$ -CD için faz çözünürlük diyagramları Şekil 4.14.'de ve Şekil 4.15.'de gösterildiği üzere  $A_L$  şeklinde bulunmuştur.  $A_L$  şeklinde çıkan diyagramlarda, Bölüm 2.2'de anlatıldığı üzere inklüzyon kompleksi hazırlamada kullanılacak siklodekstrin konsantrasyonu arttıkça çözünen ilaç konsantrasyonunun da doğrusal olarak arttığı görülmektedir. Bu bulgular ışığında ilerleyen deneysel aşamalarda doğal

siklodekstrinlerden asosiasyon katsayısı büyük olan HP- $\beta$ -CD ile çalışılmış ve çözünürlüğün bu sayede beş kat artırıldığı hesaplanmıştır.



Şekil 4.14.  $\beta$ -CD'e ilişkin faz çözünürlük diyagramı (n=3±SS)



Şekil 4.15. HP- $\beta$ -CD'e ilişkin faz çözünürlük diyagramı (n=3±SS)

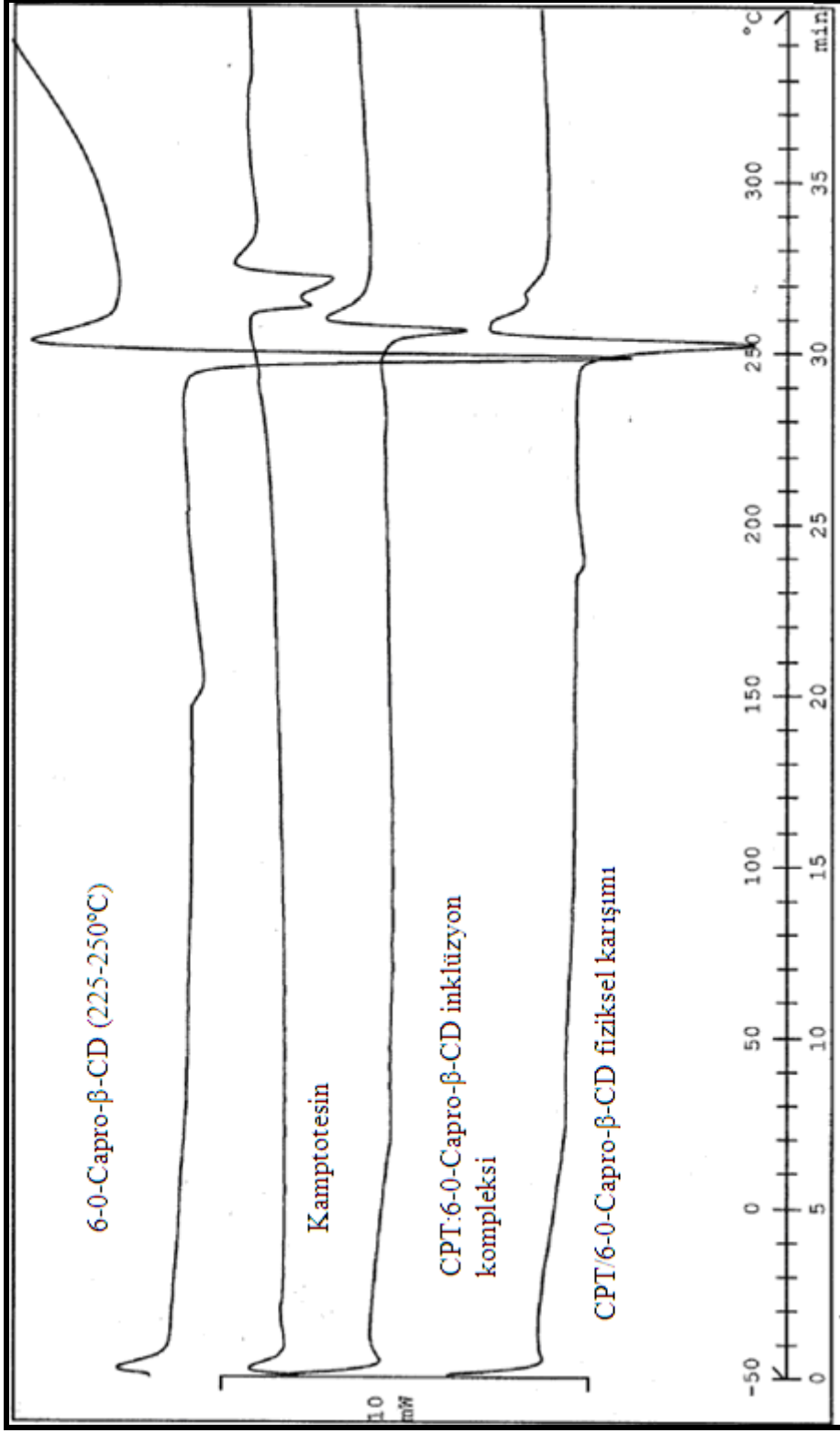
## 4.2. Hazırlanan İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu

### 4.2.1. Diferansiyal Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

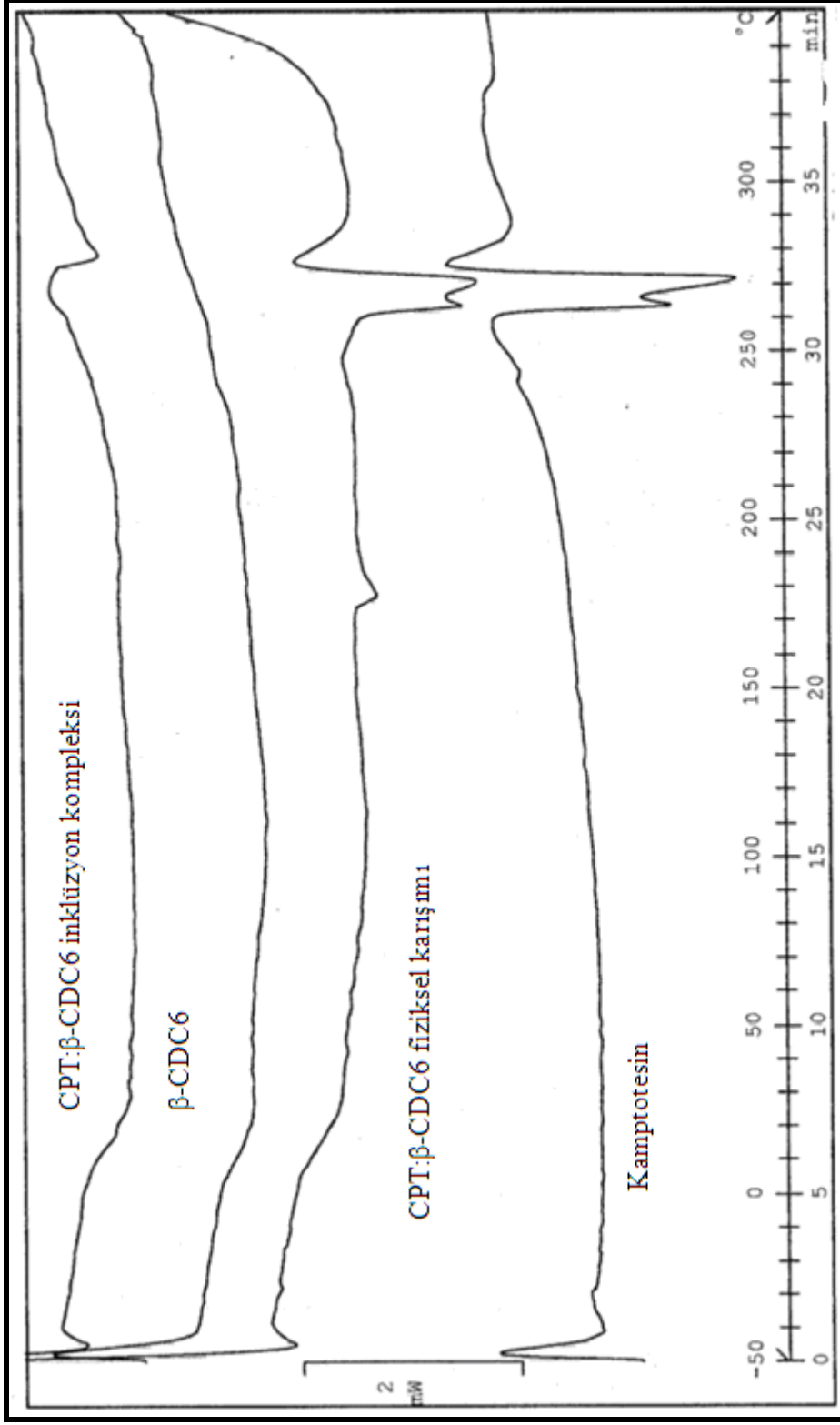
Diferansiyal taramalı kalorimetri analizi, Bölüm 3.1.8.1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kamptotesine, siklodekstrinlere, komplekslere ve fiziksel karışımlara ilişkin DSC termogramları Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de verilmiştir.

DSC termogramları ile kamptotesinin erime derecesinin 264-267°C olduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu termogramlarda, tez çalışmalarında kullanılan doğal siklodekstrinlerden HP- $\beta$ -CD ile amfifilik siklodekstrinlerden 6-O-Capro- $\beta$ -CD ve  $\beta$ -CDC6 moleküllerinin kamptotesin ile aynı bölgede erime endotermi vermedikleri de gözlenmiştir. Aynı şekilde etkin maddenin doğal ve amfifilik siklodekstrinler ile komplekslerinin de kamptotesin ile aynı bölgede erime endotermine rastlanamamıştır.

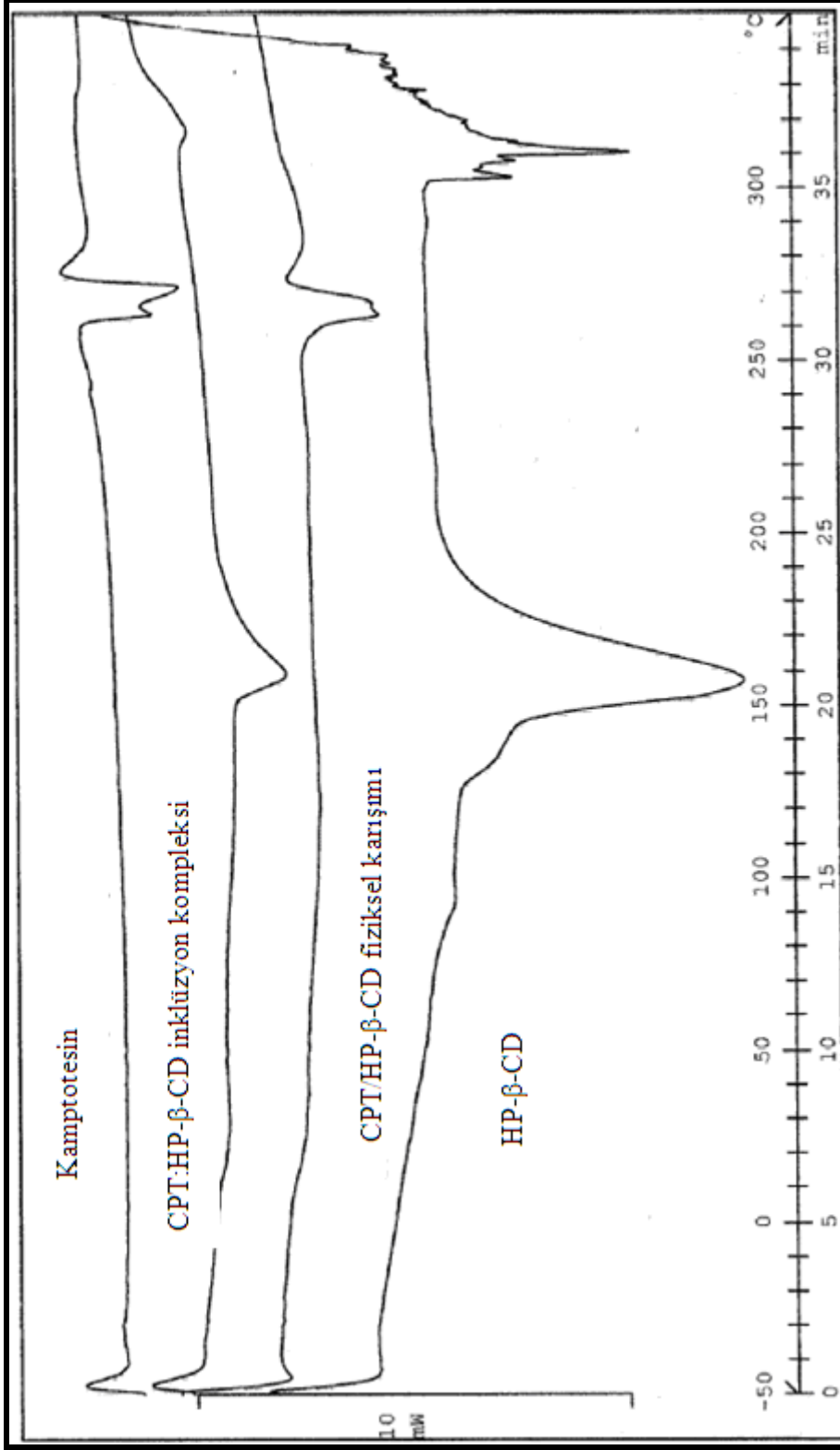
Bu bulgular, komplekslerde kamptotesinin serbest kristalize halde bulunmadığını göstermektedir. Elde edilen veriler bize, kamptotesinin inküzyon komplekslerinin başarı ile hazırlandığını göstermektedir.



Şekil 4.16. Kamptotesine, 6-O-Capro-β-CD'e, CPT:6-O-Capro-β-CD inklüzyon kompleksine ve CPT/6-O-Capro-β-CD fiziksel karışımına ilişkin DSC termogramları



Şekil 4.17. Kamptotesine, β-CDC6'ya, CPT:β-CDC6 inklüzyon kompleksine ve CPT/β-CDC6 fiziksel karışımına ilişkin DSC termogramları



Şekil 4.18. Kamptotesine, HP-β-CD'e, CPT:HP-β-CD inklüzyon kompleksine ve CPT/HP-β-CD fiziksel karışımına ilişkin DSC termogramları

#### 4.2.2. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

Fourier transform infrared spektrumu çekilmesine ilişkin çalışmalar, Bölüm 3.1.8.2’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kamptotesin, HP- $\beta$ -CD, 6-O-Capro- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CDC6 ve hazırlanan komplekslerin FT-IR spektrumları Şekil 4.19-4.21’de görülmektedir.

CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD kompleksinde:

- 3700-3100  $\text{cm}^{-1}$ ’de O-H gerilme titreşimleri
- 3000-2850  $\text{cm}^{-1}$ ’de alifatik C-H gerilme titreşimleri
- 1700-1800  $\text{cm}^{-1}$ ’de ester grubuna karakteristik C=O gerilme bantları
- 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$  arasında C-O-C gruplarına ilişkin güçlü gerilme titreşimleri;

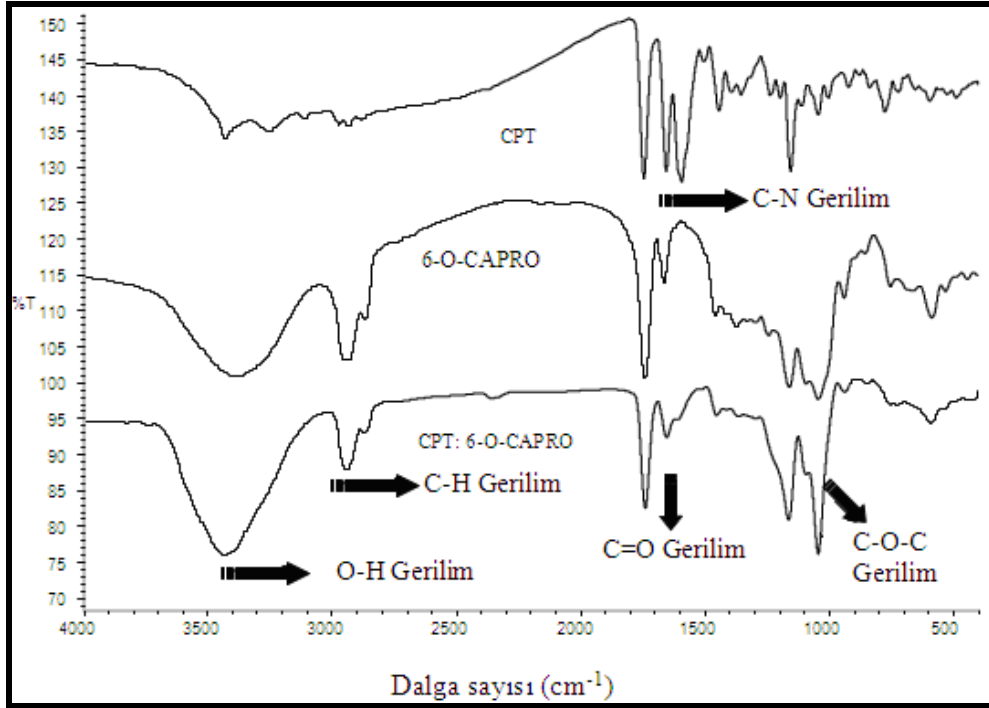
CPT: $\beta$ -CDC6 kompleksinde:

- 3700-3100  $\text{cm}^{-1}$ ’de O-H gerilme titreşimleri
- 3100  $\text{cm}^{-1}$ ’de  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  gerilme titreşimleri
- 3000-2850  $\text{cm}^{-1}$ ’de alifatik C-H gerilme titreşimleri
- 1700-1800  $\text{cm}^{-1}$ ’de ester grubuna karakteristik C=O gerilme bantları
- 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$  arasında C-O-C gruplarına ilişkin güçlü gerilme titreşimleri;

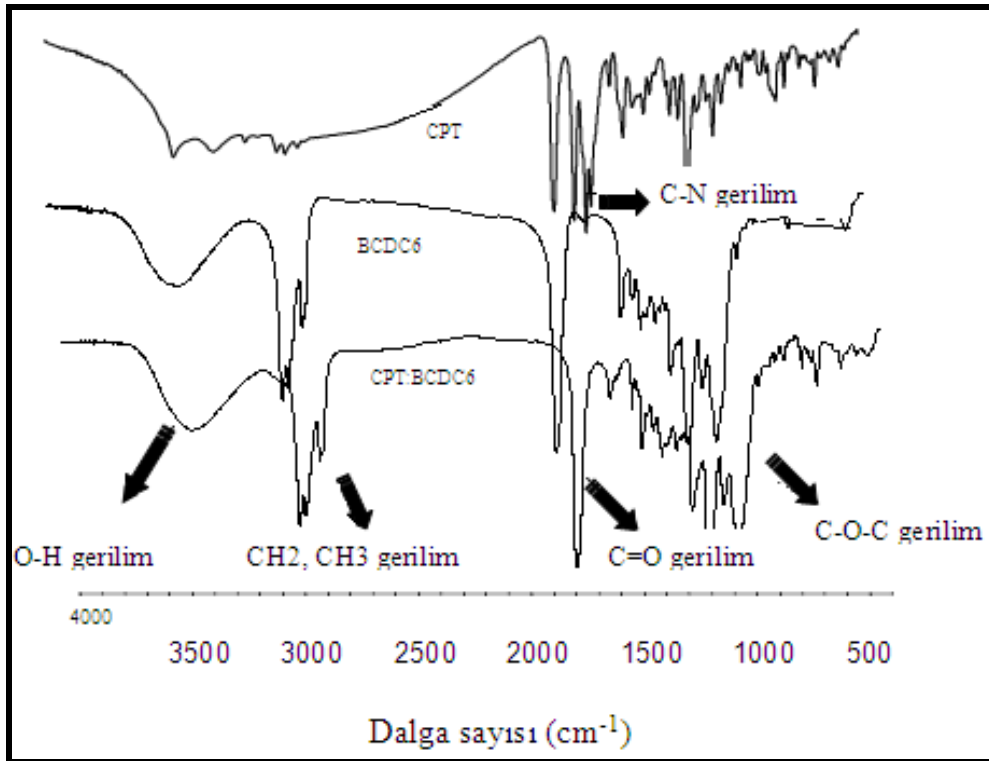
CPT:HP- $\beta$ -CD kompleksinde:

- 3700-3100  $\text{cm}^{-1}$ ’de O-H gerilme titreşimleri

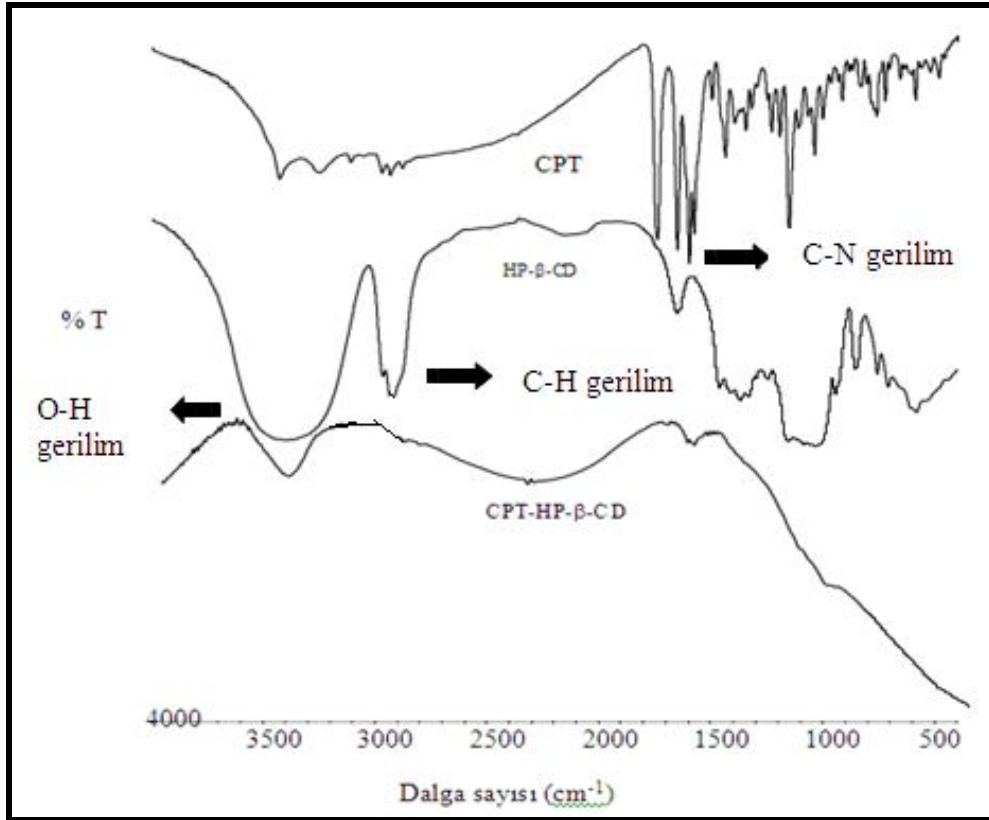
gözlenmektedir. Bütün bu pikler incelendiğinde, Bölüm 4.1.3’de belirtilen kamptotesine ilişkin piklerin hepsinin görülmediği tespit edilmiştir. Hazırlanan komplekslerin özellikleri kamptotesinden farklı olduğu için inklüzyon komplekslerinin başarı ile hazırlandığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.19. Kamptotesine, 6-O-Capro- $\beta$ -CD'e ve hazırlanan CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ilişkin FT-IR spektrumları



Şekil 4.20. Kamptotesine,  $\beta$ -CDC6'ya ve hazırlanan CPT: $\beta$ -CDC6 inklüzyon kompleksine ilişkin FT-IR spektrumları



Şekil 4.21. Kamptotesine, HP-β-CD'e ve hazırlanan CPT:HP-β-CD inklüzyon kompleksine ilişkin FT-IR spektrumları

### 4.2.3. <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

Kamptotesine, doğal ve amfifilik siklodekstrinlere, hazırlanan komplekslere ilişkin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları, Bölüm 3.1.8.4'de belirtildiği şekilde çekilmiş ve sonuçlar Şekil 4.22-4.27'de gösterilmiş, Tablo 4.7'de ise 6-O-Capro-β-CD, β-CDC6 ve HP-β-CD'e ilişkin protonların kamptotesin ile kompleksleşmeden önceki ve sonraki kimyasal kayma değerleri belirtilmiştir.

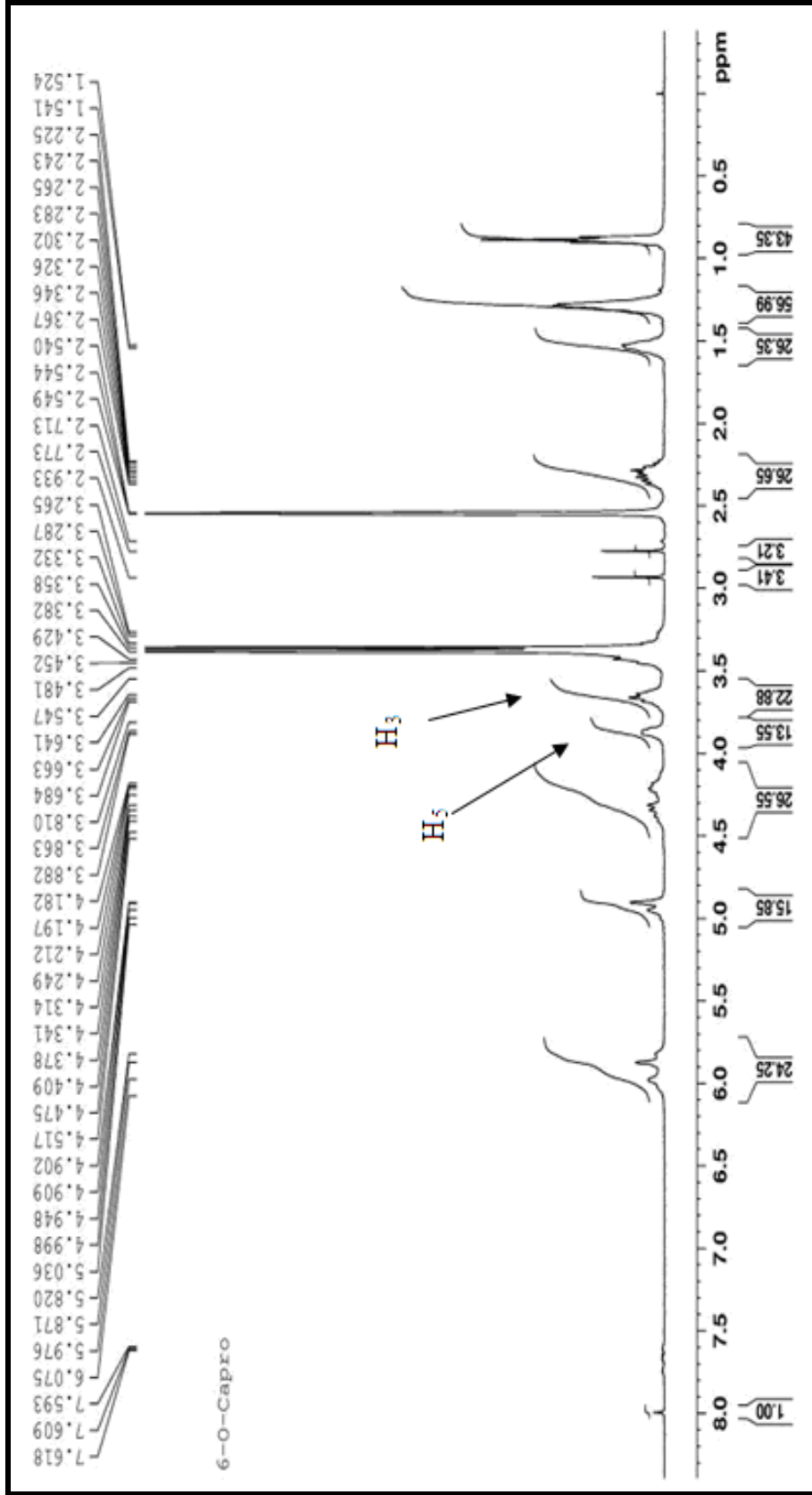
<sup>1</sup>H-NMR spektroskopisi ile etkin maddenin siklodekstrin kavitesine girişimi proton etkileşimlerine dayanarak gösterilmektedir. Inklüzyon kompleksi oluşumu sırasında bazı protonların kimyasal çevresi değişmekte bu da <sup>1</sup>H-NMR çizgilerinde değişikliklere neden olmaktadır. Inklüzyon kompleksi oluşumu sonrası konuk ilaç molekülleri kavite içerisine girdikleri zaman, kavite iç kısmındaki H-3 ve H-5

atomlarının  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda kaymalara neden olmaktadır. Siklodekstrin kavitesinin dış kısmında yer alan H-1, H-2 ve H-4 protonları bu durumdan etkilenmemektedir. Bu açıdan yaklaşıldığında, kamptotesin ile kompleks oluşumu sonrası 6-O-Capro- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CDC6 ve HP- $\beta$ -CD spektrumlarının H-3 ve H-5 protonlarında kaymalar olduğu görülmektedir. 6-O-Capro- $\beta$ -CD için H-5 3.86 ppm'den 3.88 ppm'e; H-3 3.66 ppm'den 3.63 ppm'e kaymıştır.  $\beta$ -CDC6 için H-5 4.10 ppm'den 4.6 ppm'e kayarken; H-3'de değişiklik gözlenmemiştir. HP- $\beta$ -CD'de ise H-5 3.752 ppm'den 3.755 ppm'e; H-3 3.614 ppm'den 3.613 ppm'e kaymıştır.

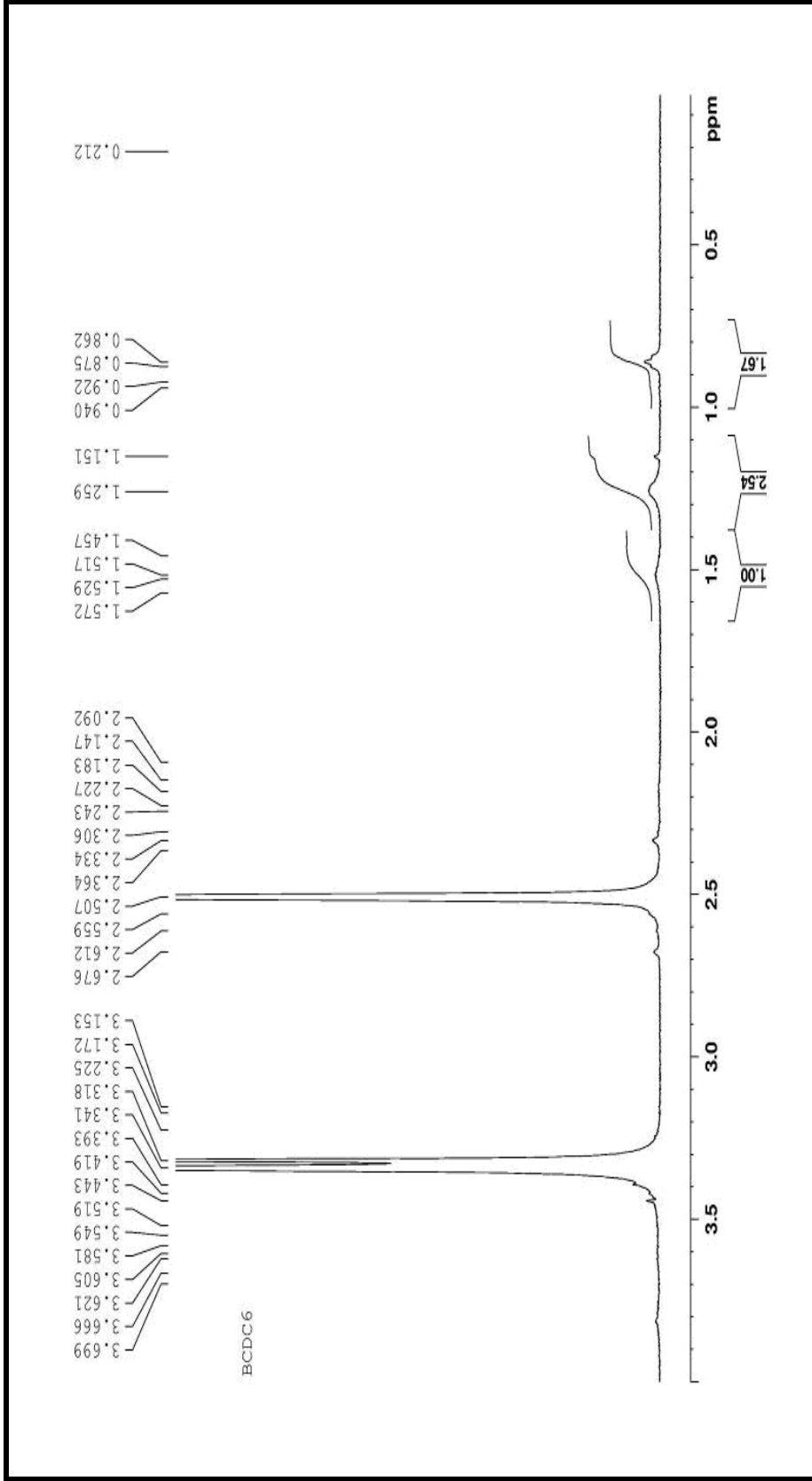
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda görülen bu kayma değerleri dikkate alındığında kamptotesinin inklüzyon komplekslerinin istenen şekilde hazırlanabildiği sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 4.7. 6-O-Capro- $\beta$ CD,  $\beta$ -CDC6 ve HP- $\beta$ -CD'e ilişkin protonların kamptotesin ile kompleksleşmeden önceki ( $\delta_{\text{CD}}$ ) ve sonraki ( $\delta_{1:1}$ ) kimyasal kayma değerleri

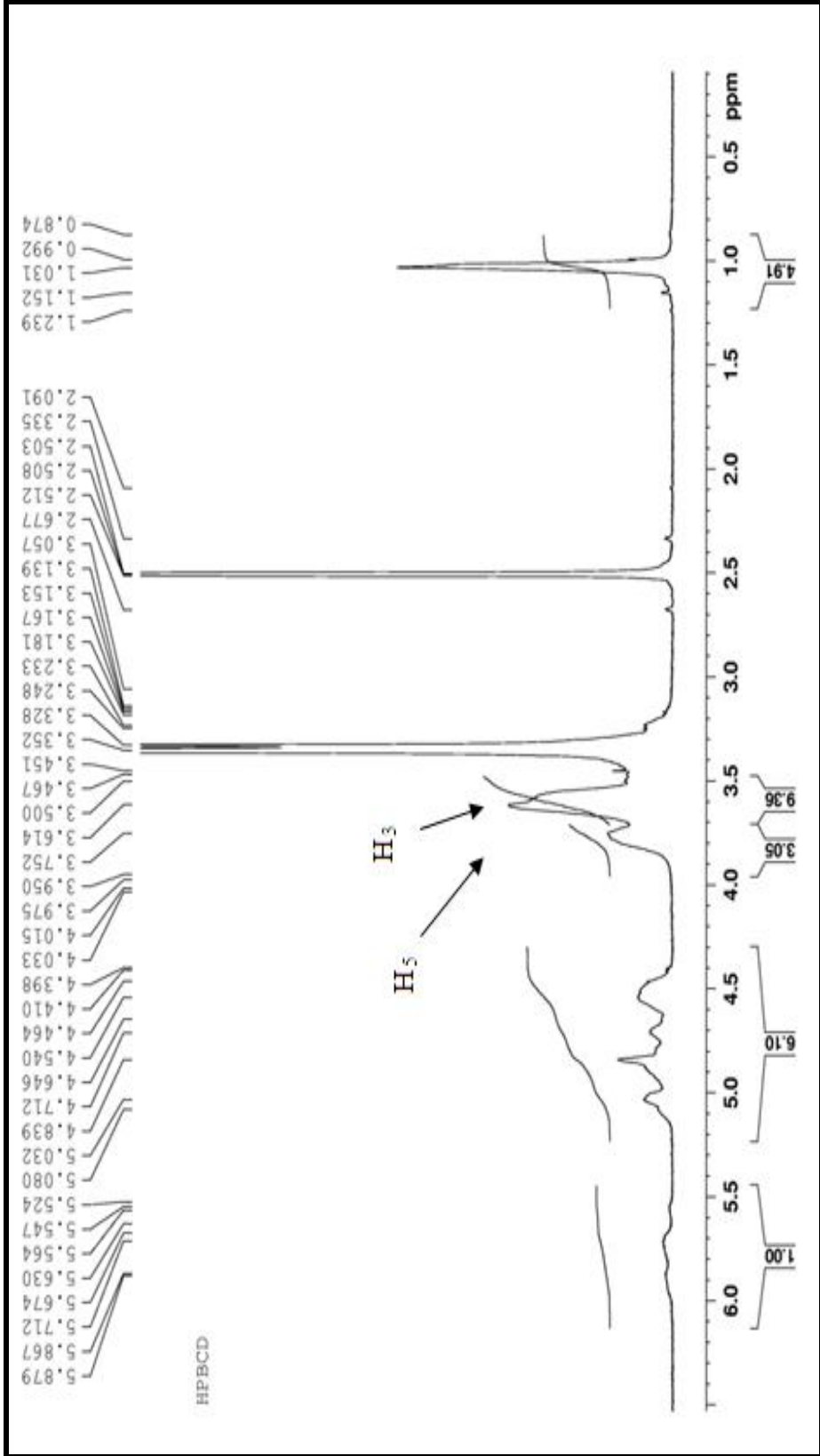
Protonlar		$\delta_{\text{CD}}$	$\delta_{1:1}$
6-O-Capro- $\beta$ -CD	H-3	3.66	3.63
	H-5	3.86	3.88
$\beta$ -CDC6	H-3	5.30	5.30
	H-5	4.10	4.60
HP- $\beta$ -CD	H-3	3.614	3.613
	H-5	3.752	3.755



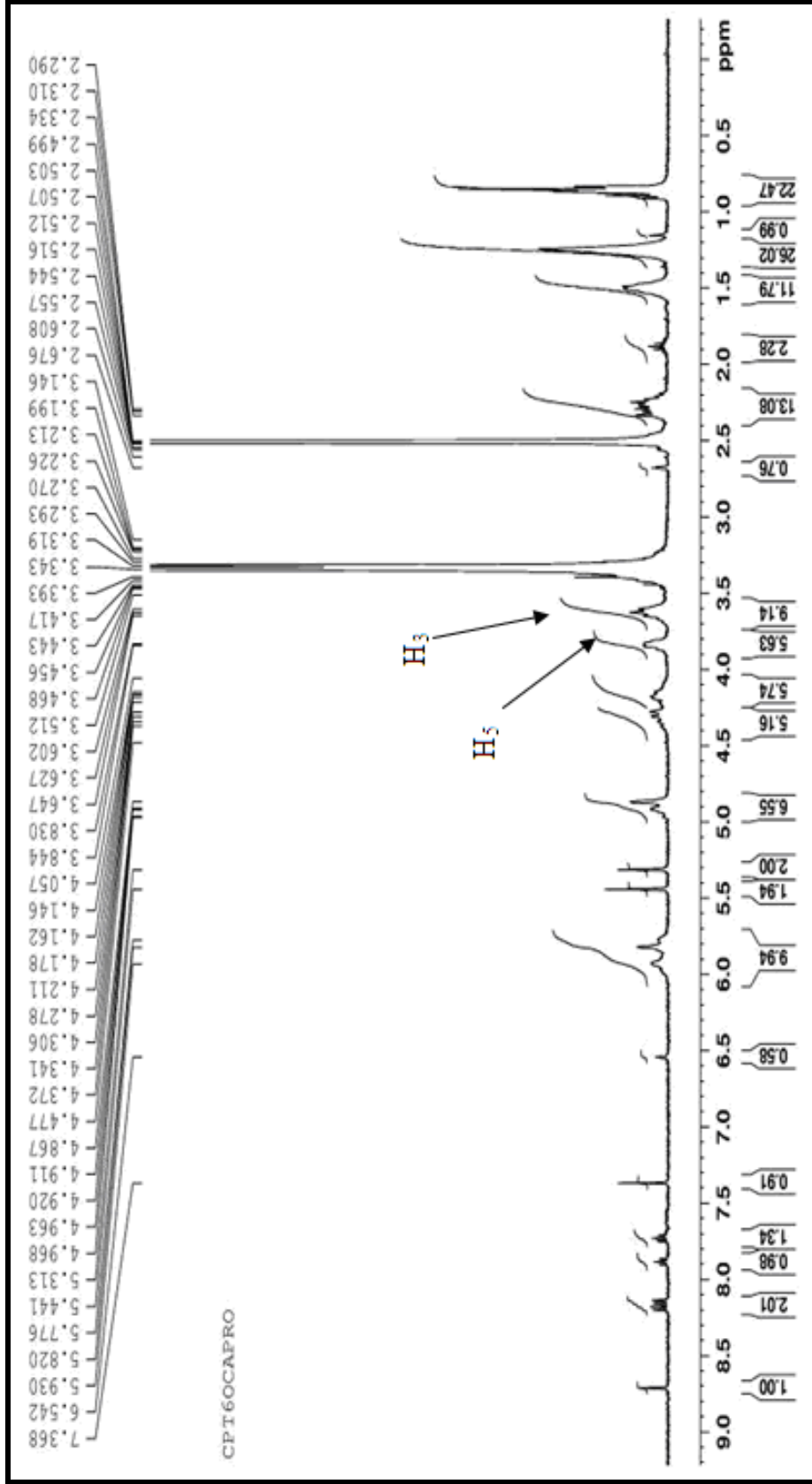
Şekil 4.22. 6-O-Capro- $\beta$ -CD'e ilişkin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



Şekil 4.23.  $\beta$ -CDC6'e ilişkin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

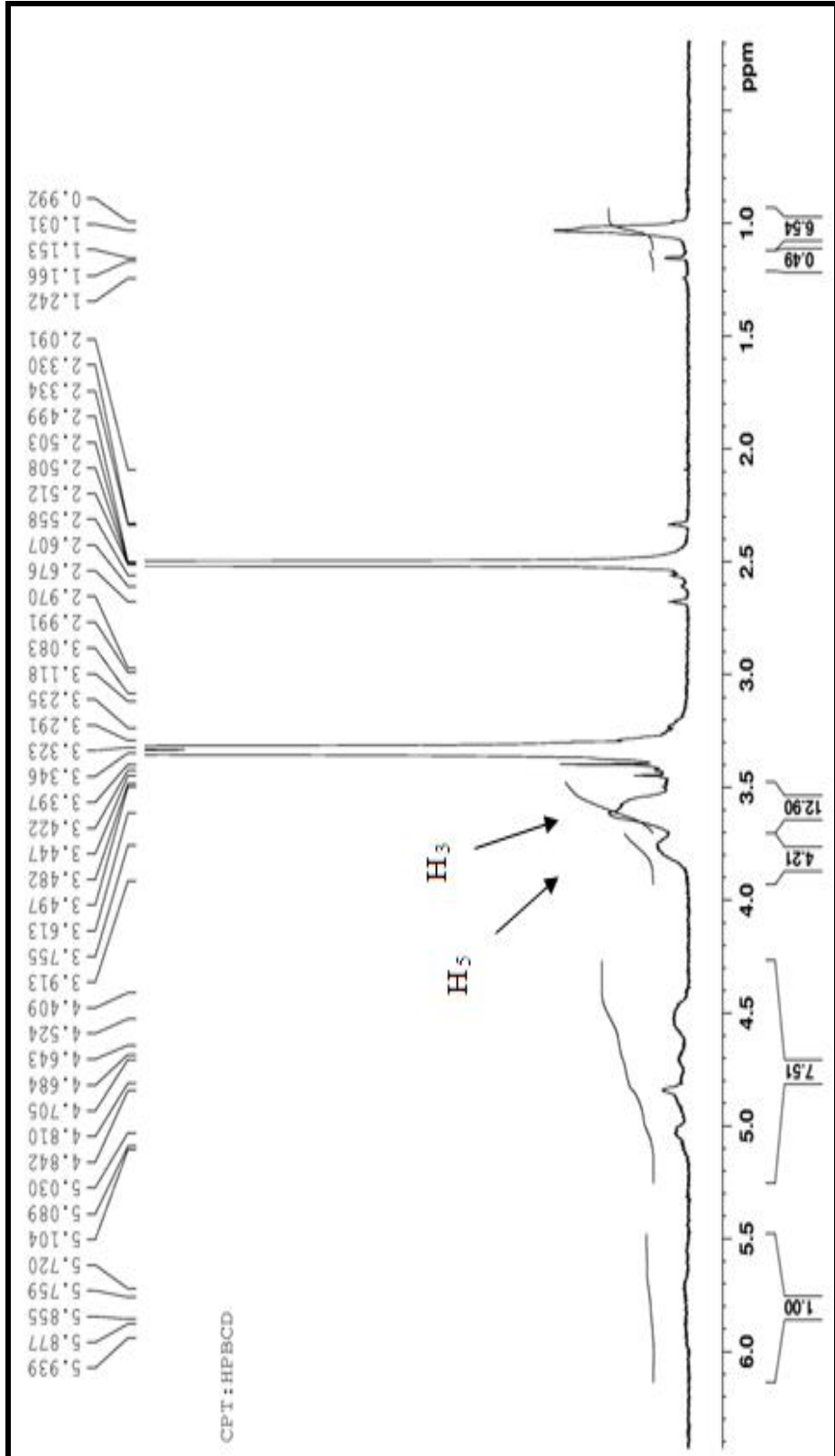


Şekil 4.24. HP- $\beta$ -CD'e ilişkin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



Şekil 4.25. CPT:6-O-Capro-β-CD inklüzyon kompleksine ilişkin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



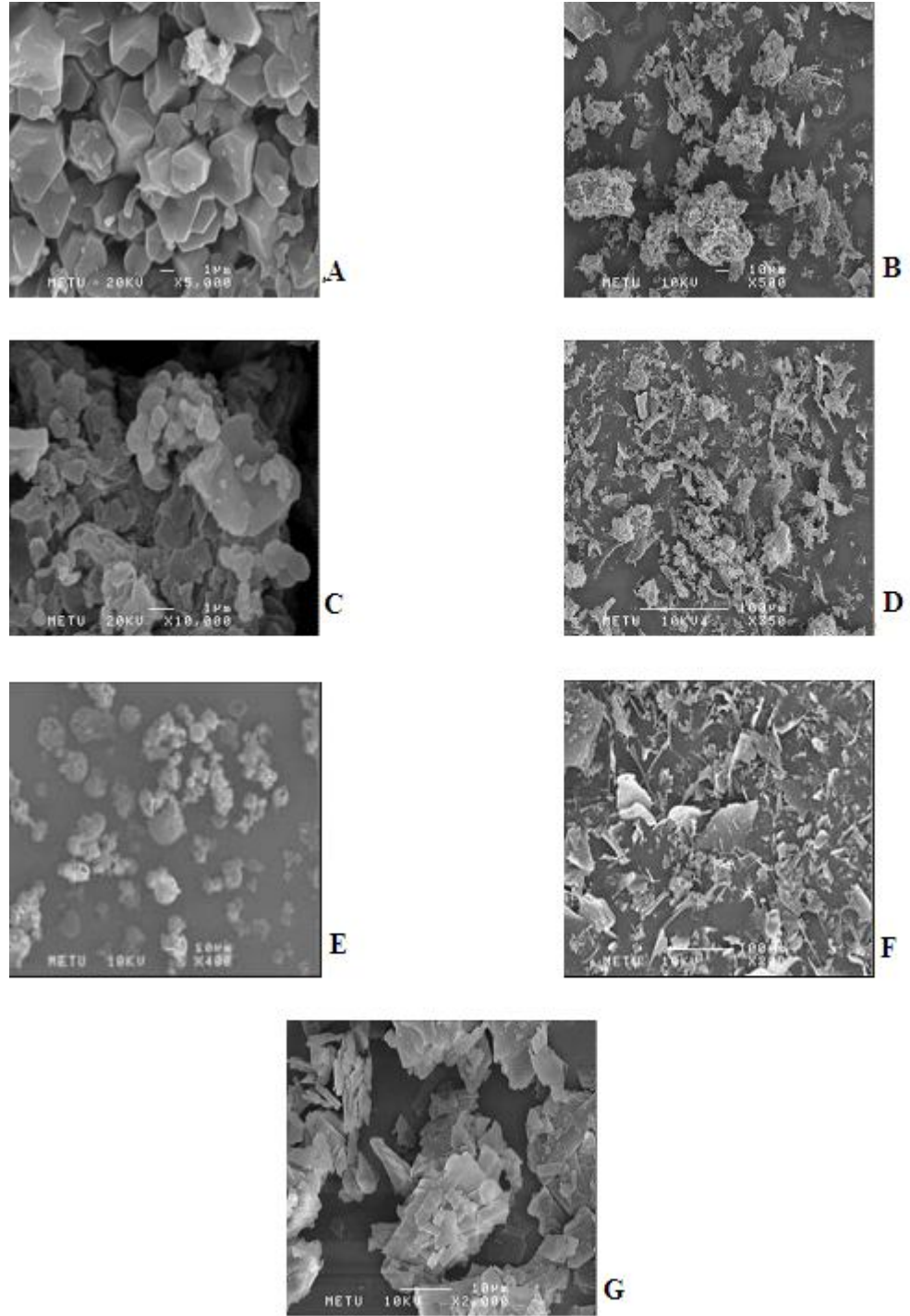


Şekil 4.27. CPT:HP- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksine ilişkin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

#### 4.2.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Taramalı elektron mikroskop analizi, Bölüm 3.1.8.3’de bildirildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kamptotesine, siklodekstrinlere ve hazırlanan komplekslere ilişkin olarak çekilen SEM fotoğrafları Şekil 4.28.’de görülmektedir. Kamptotesin, HP- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CDC6, 6-O-Capro- $\beta$ CD ve hazırlanan komplekslerin kristal yapıları SEM görüntüleme tekniği ile incelendiğinde kamptotesinin monoklonal,  $\beta$ -CDC6’nın hegzagonal, HP- $\beta$ -CD’in amorf, 6-O-Capro- $\beta$ CD’in küresel yapıda olduğu hazırlanan komplekslerin ise planar yapıda olduğu görülmüştür. Komplekslerin farklı yapıda olması onların karakteristik fizikokimyasal özelliklerinin etkin maddeden ve siklodekstrinlerden farklı olduğunu göstermektedir. SEM fotoğraflarında kompleks hazırlama yönteminin, etkin madde ve siklodekstrinlerin kristal yapıları üzerinde değişikliklere yol açtığı görülmektedir.

SEM analizi ile inklüzyon komplekslerinin; kamptotesinden ve siklodekstrinlerden farklı görüntüde olduğunun gösterilmesi, kamptotesinin inklüzyon komplekslerinin başarı ile hazırlandığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir.



Şekil 4.28. Kamptotesine, siklodekstrinlere ve hazırlanan inklüzyon komplekslerine ilişkin SEM fotoğrafları (A:  $\beta$ -CDC6, B: CPT: $\beta$ -CDC6, C: 6-O-Capro- $\beta$ -CD, D: CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD, E:HP- $\beta$ -CD, F: CPT:HP- $\beta$ -CD, G: CPT)

### 4.3. Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu amacıyla partikül büyüklüğü ve dağılımı analizi, zeta potansiyel ölçümü, yüzey özelliklerinin incelenmesi, ilaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi, in vitro salım profilinin elde edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 4.3.1. Partikül Büyüklüğü Tayini

Partikül büyüklüğü tayini, Bölüm 3.1.9.3.1’de anlatıldığı şekilde Malvern Zetasizer nano series aleti ile gerçekleştirilmiştir. Partikül büyüklükleri, ortalama partikül büyüklüğü±standart sapma; partikül büyüklüğü dağılımı ise polidispersite indeksi şeklinde gösterilmiştir. Tablo 4.8’de görüldüğü üzere boş nanopartiküllerin partikül büyüklükleri kamptotesin yüklü nanopartiküllere göre daha küçük bulunmuştur. Bu durum, nanopartiküllere etkin madde enkapsüle edildiğinde partikül büyüklüklerinde artış olduğunu göstermektedir, bulgular literatür ile uyumlu bulunmuştur (36).

CPT:β-CDC6 kompleksi ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri (Tablo 4.8) 142 nm, standart sapması ±3, polidispersite indeksi 0.27; CPT:6-O-Capro-βCD kompleksi ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri 271 nm, standart sapması ±15, polidispersite indeksi 0.41 olarak bulunmuştur.

Kamptotesin yüklü PLGA nanopartikülleri için partikül büyüklükleri (Tablo 4.8) 187 nm, standart sapması ±9; polidispersite indeksi 0.08 iken PCL polimeri ile hazırlanan kamptotesin yüklü nanopartiküllerin partikül büyüklükleri 274 nm, standart sapması ±0.8; polidispersite indeksi 0.06 olarak bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda, hazırlanan nanopartikül formülasyonları ilgili parametreler açısından enjekte edilebilirlik olarak uygun bulunmuştur.

### 4.3.2. Zeta Potansiyel Ölçümü

Zeta potansiyel ölçümleri, Bölüm 3.1.9.3.2’de anlatıldığı şekilde Malvern Zetasizer nano series aleti ile gerçekleştirilmiştir. Bilindiği üzere, zeta potansiyelin büyüklüğü, kolloidal sistemlerin stabilitesi hakkında bilgi vermektedir ve zeta potansiyeli yüksek olan kolloidal dağılımların stabilitesinin daha iyi olduğu bilinmektedir. Partiküller yüksek negatif ya da pozitif zeta potansiyele sahiplerse, birbirlerini iterler ve dispersiyon kararlılığı oluşur. Partiküller düşük zeta potansiyel değerlerine sahiplerse, partiküllerin bir araya gelmesini sağlayacak güç oluşmaz ve dispersiyon kararsız olur. Kararlı ve kararsız dispersiyon ortamları arasındaki potansiyel aralığı +30 mV ile -30 mV’tur. Tanelerin polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü değil, zeta potansiyel değerleri belirler.

Tablo 4.8. Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PI) ve zeta potansiyeli değerleri (n=3)

Formülasyonlar	Ortalama partikül büyüklüğü (nm) ± S.S.	PI	Zeta potansiyel (mV) ± S.S.
Boş β-CDC6 nanopartikülleri	130 ± 0.5	0.07	-16 ± 0.9
CPT:β-CDC6 nanopartikülleri	142 ± 3	0.27	-22 ± 0.7
Boş 6-O-Capro-βCD nanopartikülleri	194 ± 4	0.2	-25 ± 1.3
CPT:6-O-Capro-βCD nanopartikülleri	271 ± 15	0.41	-13 ± 0.9
Boş PLGA nanopartikülleri	178 ± 1	0.05	4,61 ± 2.76
Kamptotesin yüklü PLGA nanopartikülleri	187 ± 9	0.08	-0.06 ± 1
Boş PCL nanopartikülleri	189 ± 4	0.2	-12 ± 0.6
Kamptotesin yüklü PCL nanopartikülleri	274 ± 0.8	0.06	-19 ± 0.2

CPT: $\beta$ -CDC6 kompleksi ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri -22, standart sapması  $\pm 0.7$ ; CPT:6-O-Capro- $\beta$ CD kompleksi ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri -13, standart sapması  $\pm 0.9$  olarak bulunmuştur.

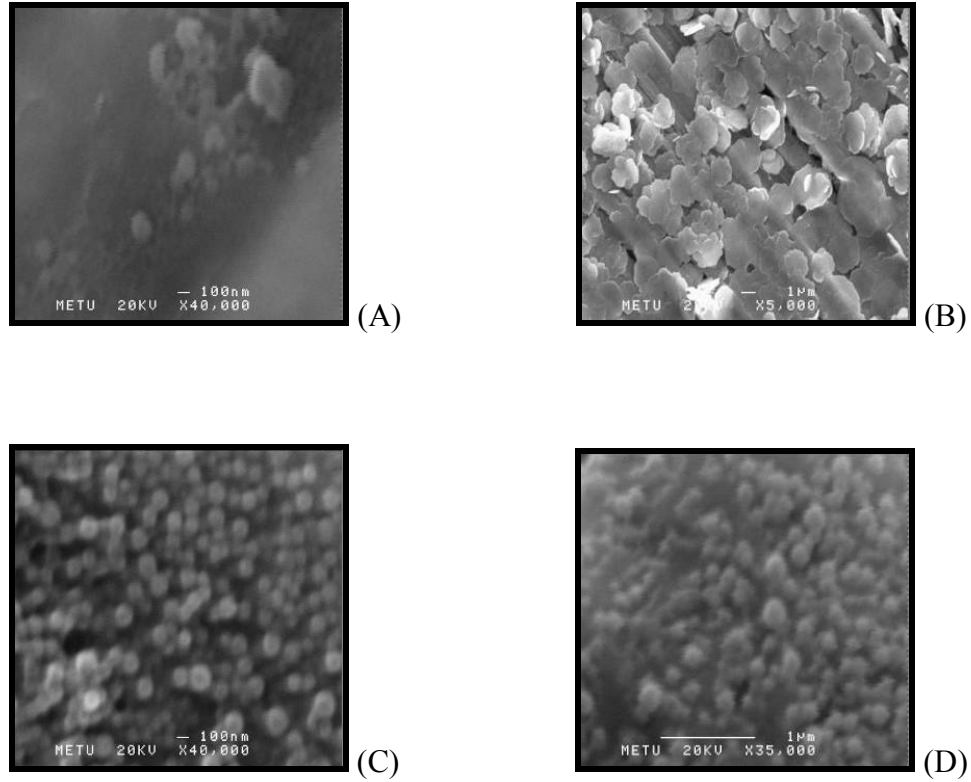
PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri -0.06, standart sapması  $\pm 1$ ; PCL ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri -19, standart sapması  $\pm 0.2$  olarak bulunmuştur. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel (mV) değerleri Tablo 4.8'de görülmektedir.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonları stabilitenin sağlanması açısından zeta potansiyel değerleri uygun bulunmuştur.

### **4.3.3. Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi**

#### **4.3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi**

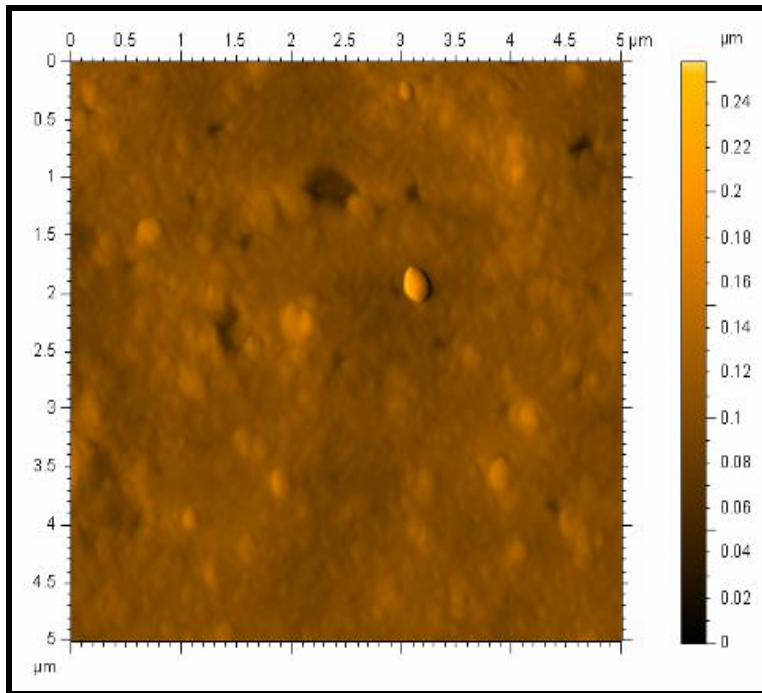
Kamptotesin yüklü nanopartiküllerin yüzey özellikleri Bölüm 3.1.9.3.3.'te anlatıldığı şekilde taramalı elektron mikroskopu ile incelenmiştir. Şekil 4.29'da hazırlanan formülasyonlara ilişkin SEM fotoğrafları yer almaktadır. Yüzey fotoğrafları incelendiğinde, nanopartiküllerin homojen, küresel ve düzgün yüzeyli oldukları görülmektedir.



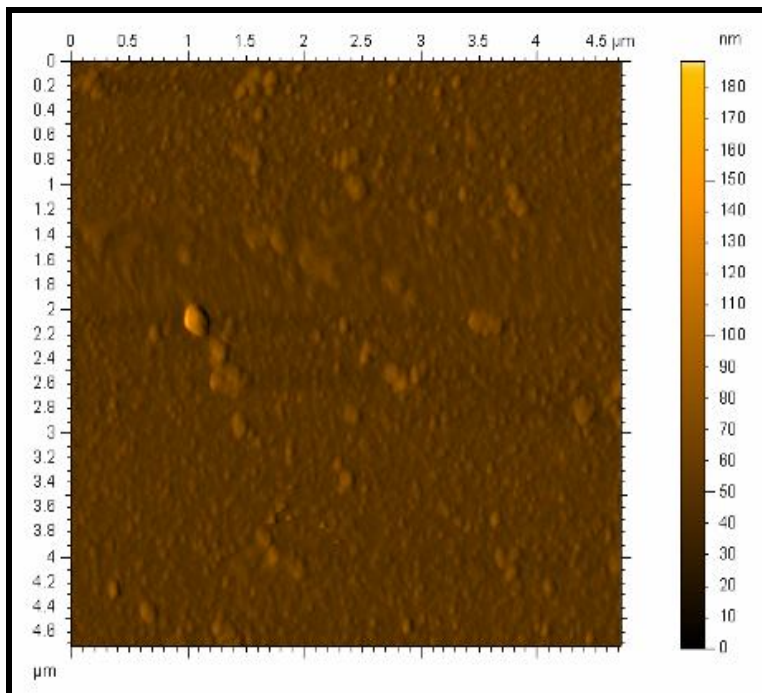
Şekil 4.29. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları (A: 6-O-Capro- $\beta$ CD, B:  $\beta$ -CDC6, C: PLGA, D: PCL nanopartikülleri)

#### 4.3.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Analizi

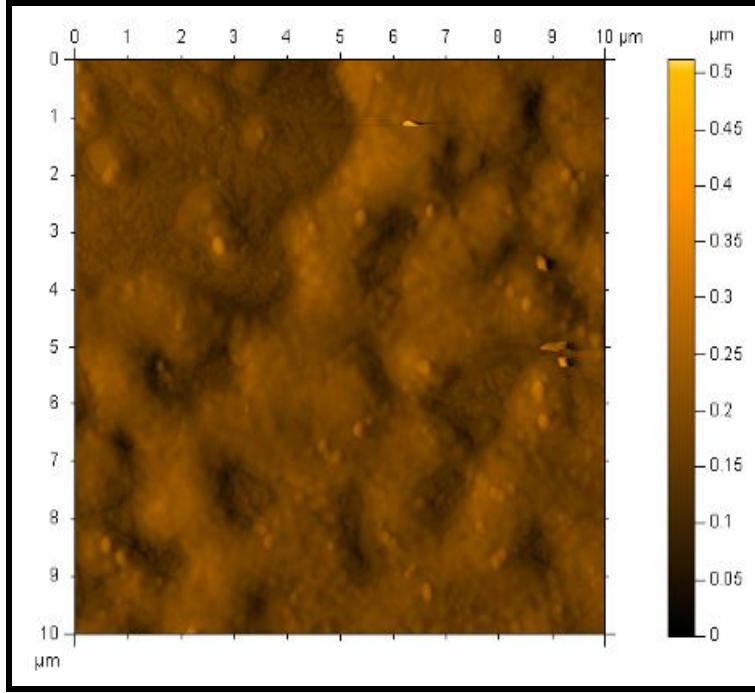
Formülasyonların AFM analizleri Bölüm 3.1.9.3.3.'te belirtildiği şekilde atomik kuvvet mikroskopu ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının morfolojik yapılarını açıklayan AFM görüntüleri Şekil 4.30'da gösterilmektedir. AFM fotoğrafları incelendiğinde, nanopartiküllerin küresele yakın oldukları görülmektedir. Örnekler konsantre olduğu için agregasyon gözlenmiştir.



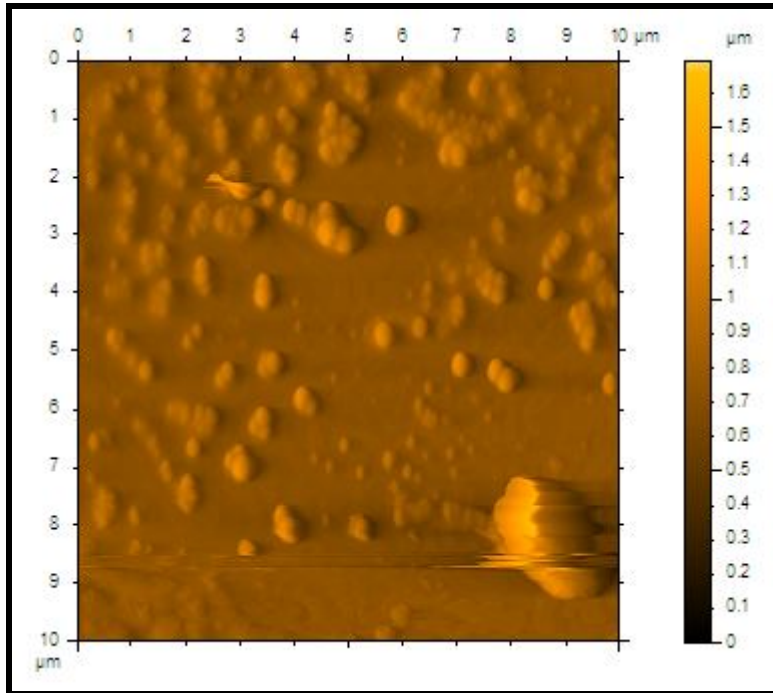
(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 4.30. Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin AFM fotoğrafları (A: 6-O-Capro- $\beta$ CD, B:  $\beta$ -CDC6, C: PCL, D: PLGA nanopartikülleri)

#### 4.3.3.3. İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Formülasyonların ilaç yükleme etkinlikleri, Bölüm 3.1.9.4'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Amfifilik siklodekstrinler ile hazırlanan nanopartiküller yüksek yükleme tekniği kullanılarak nanopresipitasyon metoduna göre hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin kamptotesin ve amfifilik siklodekstrin kompleksinden hareketle “yüksek yükleme tekniğine” göre hazırlanması ilaç yükleme kapasitesini artırmada etkili bir yöntem olmuştur. HP- $\beta$ -CD ile hazırlanan polimerik nanopartiküller de nanopresipitasyon yöntemine göre Bölüm 3.1.9.2.1. ve Bölüm 3.1.9.2.2'de belirttikleri şekilde hazırlanmışlardır. Bütün nanopartikül formülasyonları doğrudan inklüzyon komplekslerinden hareketle hazırlanmıştır.

Nanopartiküllere hapsolan ilaç miktarı; santrifüj işlemi sonrası bağlanmayan serbest ilacın ayrılmasını takiben, nanopartikül dispersiyonu içerisinde saptanan total ilaç miktarı ( $\mu\text{g}$ )'dır. Asosiye ilaç yüzdesi (%) ve hapsolma etkinliği ( $\mu\text{g}$  ilaç / mg siklodekstrin) değerleri, hapsolan ilaç miktarından hareketle Bölüm 3.1.9.4.'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllere ilişkin ilaç yükleme değerleri Tablo 4.9'da gösterilmektedir. İlaç yükleme etkinliği bulguları literatür çalışmalarına benzer bulunmuştur (173, 178).

Tablo 4.9. Nanopartiküllere ilişkin ilaç yükleme kapasitesi değerleri

Formülasyonlar	Hapsolan Miktar ( $\mu\text{g}$ ) ( $\pm\text{S.S.}$ )	Hapsolma Etkinliği ( $\pm\text{S.S.}$ )	% Asosiye İlaç ( $\pm\text{S.S.}$ )
CPT: $\beta$ -CDC6 nanopartikülleri	28 $\pm$ 2	32 $\pm$ 4	9 $\pm$ 1
CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD nanopartikülleri	48 $\pm$ 4	57 $\pm$ 11	13 $\pm$ 3
PLGA nanopartikülleri	13 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.03
PCL nanopartikülleri	7.2 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.2

#### 4.3.3.4. Nanopartiküllerden Kamptotesinin İn Vitro Salımı

Nanopartikül formülasyonlarından kamptotesinin salım çalışmaları Bölüm 3.1.9.5'te belirtildiği şekilde diyaliz membran yöntemine göre yapılmıştır. Şekil 4.31.'de nanopartikül formülasyonlarına ilişkin zamana karşı % kümülatif salınan etkin madde miktarlarını gösteren salım grafikleri verilmiştir.

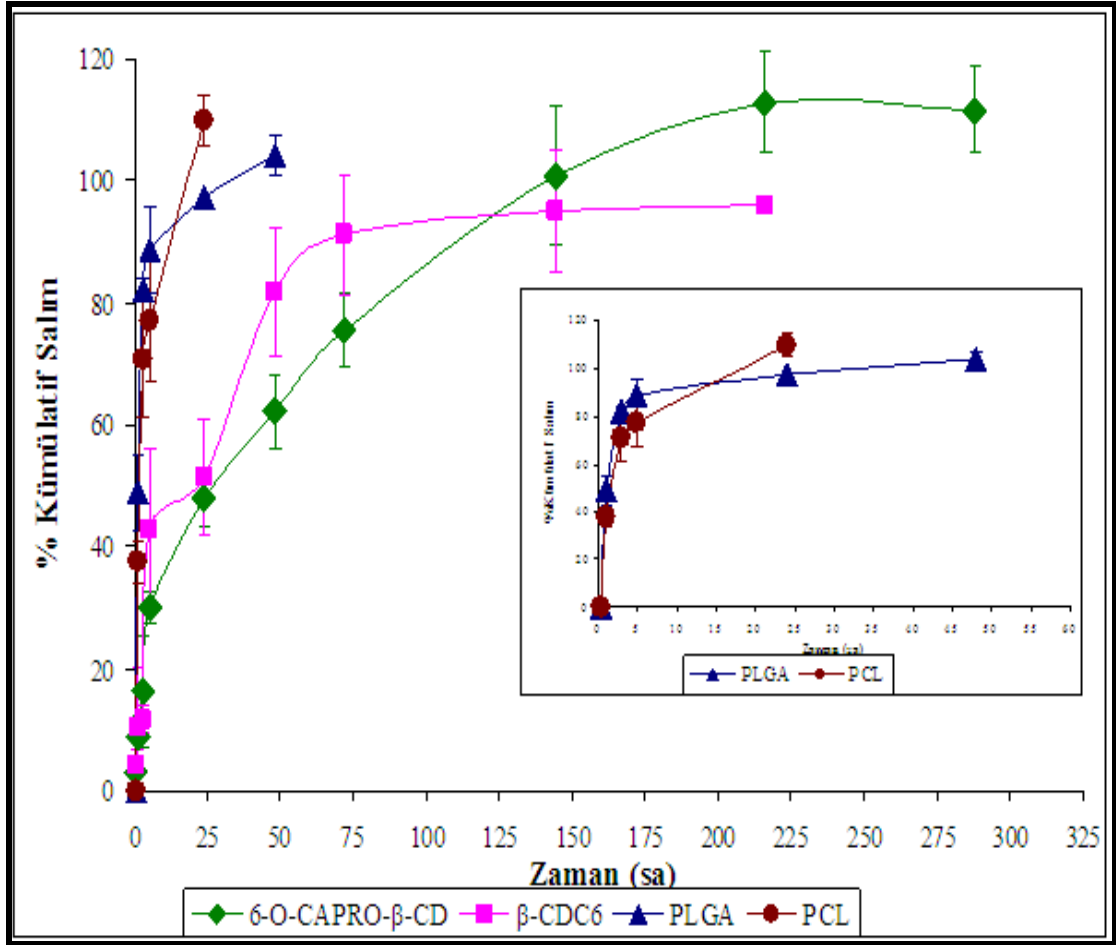
Salım grafikleri incelendiğinde, CPT:β-CDC6 kompleksi kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salımı ilk beş saat içinde % 50 olarak gerçekleşmiştir. 24. saat sonunda etkin maddenin aktif formunun % 81'i salınırken, 72. saat sonunda ise etkin maddenin aktif formunun % 95'inin salındığı gözlenmiştir.

6-O-Capro-β-CD nanopartiküllerinde ilk beş saat içinde etkin maddenin % 30'u salınırken, 24. saat sonunda etkin maddenin aktif formunun % 48'i salınmıştır. 144. saat sonunda ise etkin maddenin aktif formunun % 100'ü salınmış bulunmaktadır.

PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden ilaç salımında ise ilk bir saat içinde etkin maddenin % 50'si salınırken, 48. saat sonunda etkin madde salımı % 100'ü bulunmuştur.

PCL nanopartiküllerinde ilk üç saat içinde etkin maddenin % 70'i salınırken, 24. saat sonunda etkin maddenin aktif formunun tamamı salınmıştır.

İN vitro salım grafikleri Gwbasic Programı ile değerlendirildiğinde, nanopartikül formülasyonlarından etkin madde salımının Higuchi modeline uyum sağladığı görülmüştür. Amfifilik siklodekstrin nanopartikülleri ile oniki güne kadar, polimerik nanopartiküllerle kırksekiz saate kadar salım uzatılmıştır ve bütün salım çalışmaları süresince etkin maddenin aktivitesi korunarak stabilitesi artırılmıştır. Salım süresi boyunca stabilite tayini için ayrı deneysel çalışmalar yapılmamış, HPLC kromatogramlarından elde edilen pikler dikkate alınmıştır.



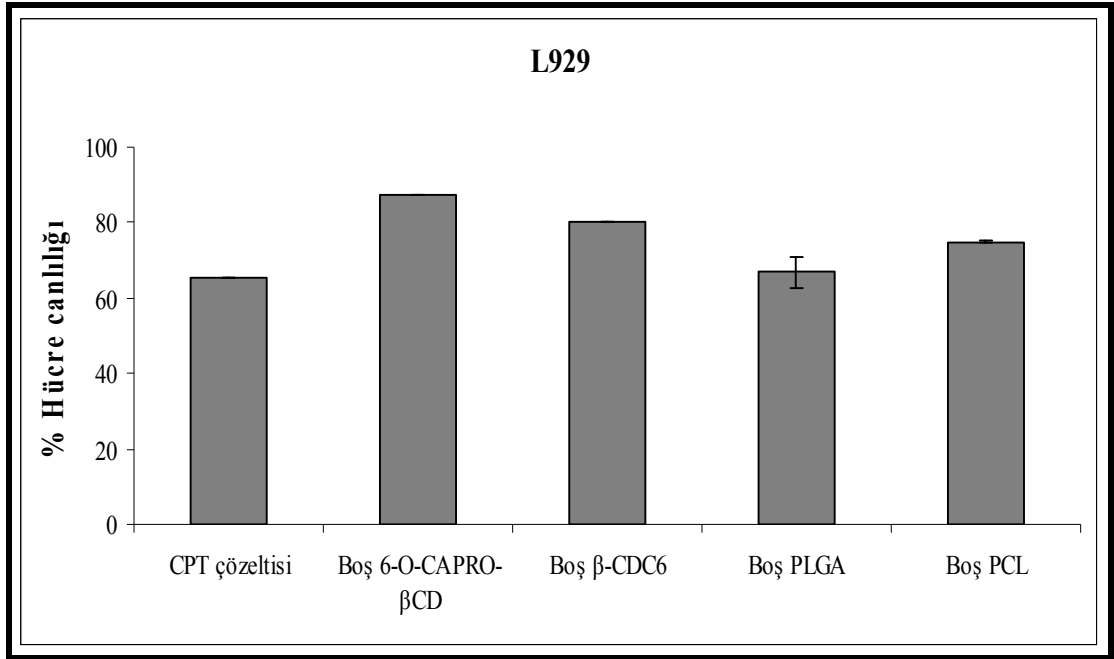
Şekil 4.31. Kamptotesin yüklü nanopartikül formülasyonlarına ilişkin in vitro salım grafikleri (n=3±SS)

#### 4.3.3.5. L-929 Fare Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksosite Testi

Etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarının L-929 fare fibroblast hücrelerinde sitotoksosite testi Bölüm 3.1.9.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128 olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda dilüe edilmiş olan kamptotesin içermeyen nanopartikül formülasyonlarının ve kamptotesinin dimetilsülfoksitteki kontrol çözeltisinin L-929 fare fibroblast hücrelerine karşı sitotoksitesini belirten, 1/128 dilüsyonuna karşı % hücre

yaşayabilirlik grafiği Şekil 4.32’de gösterilmektedir. Yapılan çalışmalar sonunda etkin madde içermeyen nanopartiküllerin toksik olmadığı gösterilmiştir ( $p>0,05$ ).

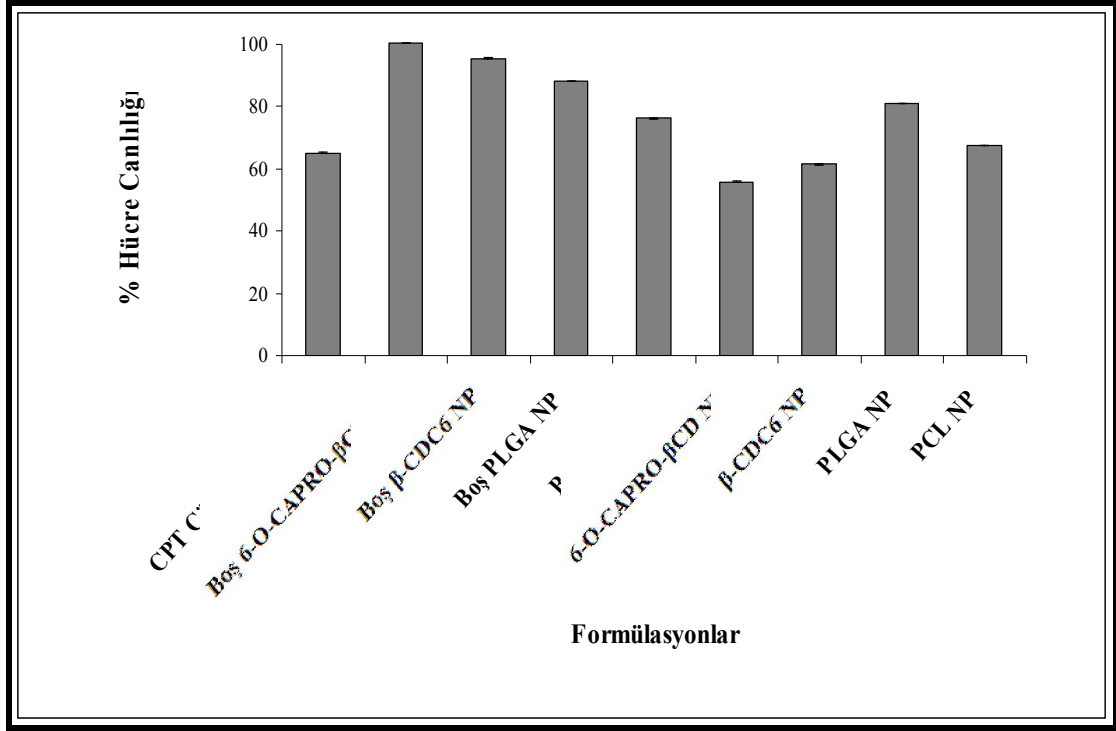


Şekil 4.32. Kamptotesin içermeyen nanopartikül formülasyonlarının ve kamptotesinin dimetilsülfoksitteki çözeltisinin 1/128 dilüsyonuna karşı gözlenen % L-929 fare fibroblast hücre yaşayabilirliği (1/128 dilüsyon) ( $n=3\pm SS$ )

#### 4.3.3.6. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Karşı Antikanser Etkinlik

Nanopartikül formülasyonlarının ve kamptotesinin dimetilsülfoksitteki kontrol çözeltisinin MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı antikanser etkinlik testi Bölüm 3.1.9.7’de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin ve kamptotesinin dimetilsülfoksitteki çözeltisinin (1/128 dilüsyon) MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitelerini gösteren grafik Şekil 4.33’de belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerinin, polimerik nanopartiküllere ve kamptotesinin DMSO’daki çözeltisine göre daha yüksek antikanser etkinlik gösterdiği bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

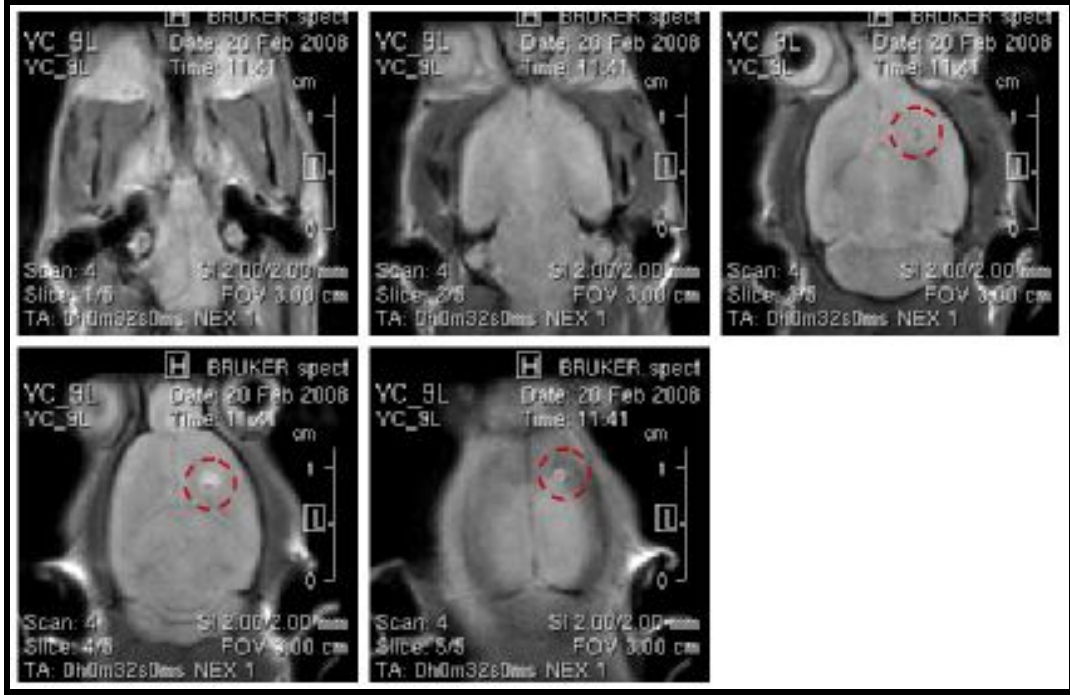


Şekil 4.33. Nanopartikül formülasyonlarının ve kamptotesinin dimetilsülfoksitteki çözeltisinin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (1/128 dilüsyon) ( $n=3\pm SS$ ) (CPT: Kamptotesin, NP: Nanopartikül)

#### 4.3.4. Sıçanlarda Beyin Glioma Modeli

##### 4.3.4.1. Magnetik Rezonans Görüntüleme

Sıçanlarda, gliosarkoma 9L hücre injeksiyonundan 5 gün sonra oluşturulan tümörlerin varlığı nükleer magnetik rezonans görüntüleme aleti ile Bölüm 3.1.9.8.3.'de açıklandığı şekilde görüntülenmiştir. Şekil 4.34.'de oluşturulan tümörün MR görüntüleri verilmiştir.

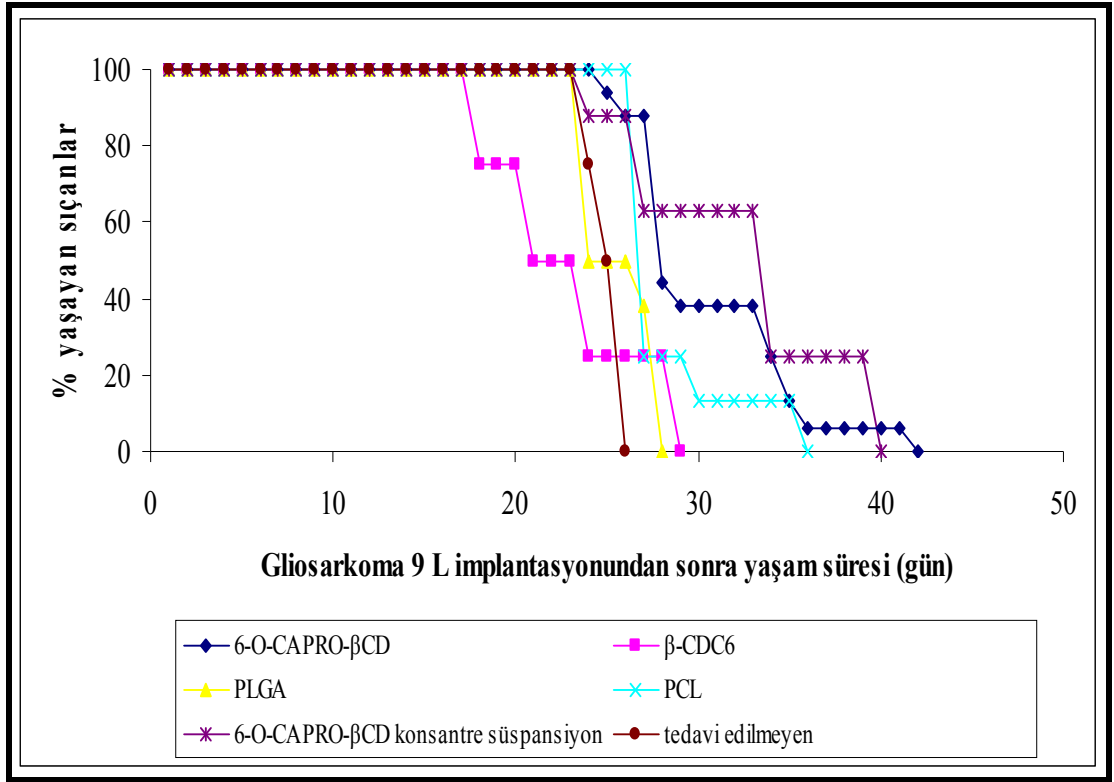


Şekil 4.34. Sıçanlarda 9L hücreleri ile oluşturulan tümörlerin nükleer magnetik rezonans görüntüleme aleti ile gösterilmesi

#### 4.3.4.2. Oluşturulan Tümörlerin Kamptotesin İçeren Nanopartikül Süspansiyonu ile Tedavisi

Gliosarkoma 9L hücreleri ile oluşturulan tümörler Bölüm 3.1.9.8.4.'de anlatıldığı şekilde 6. günde 60  $\mu$ L nanopartikül süspansiyonu ile tedavi edilmiştir. 60  $\mu$ L  $\beta$ -CDC6 nanopartikül süspansiyonu ile sıçanlara verilen kamptotesin miktarı 849,6 ng iken, 6-O-Capro- $\beta$ CD ile bu miktar 1574,4 ng, PLGA ve PCL formülasyonları için bu değerle sırasıyla 398,39 ng ve 216,02 ng olarak hesaplanmıştır.

CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD nanopartikülleri ve 3148,8 ng kamptotesin içeren CPT:6-O-Capro- $\beta$ -CD konsantre nanopartikülleri ile yapılan tedavinin; tedavi edilmeyen gruba göre sıçanların yaşam sürelerini istatistiksel olarak artırdığı gösterilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Nanopartikül süspansiyonu ile tedavi edilen sıçan gruplarının yaşam süresi

## 5. TARTIŞMA

Kamptotesin, memeli hücrelerde antikanser etkinliğini hem DNA hem de RNA sentezini inhibe ederek göstermektedir (148). RNA sentezinin inhibisyonu, RNA zincirlerinin kısalmasına bağlıdır ve ilacın kullanımı sonlandırıldığında zincir uzunluğu hızla eski haline dönmektedir, buna karşın DNA sentezinin inhibisyonu ise ilaç kullanımı bırakıldığında kısmen geri dönüşlüdür. Bu nedenle, kamptotesin en güçlü aktivitesini hücrel DNA'yı hızlı ve geri dönüşlü olarak parçalayarak göstermektedir.

Literatürde, kamptotesinin etkili bir biçimde taşınmasını sağlamak amacıyla farklı ilaç taşıyıcı sistemlerle çalışıldığı görülmektedir. Literatürde çalışılmış olan kamptotesin taşıyıcı sistemler arasında PEG konjüge kamptotesin, PLGA nanopartikül ve mikroküreleri, lipid bazlı nanoölçekte sistemler olan katı lipid nanoküreler, okside selüloz mikroküreler, lipozomlar, miseller, mikroemülsiyonlar bulunmaktadır (148, 163, 151, 172, 193-198). Bu ilaç taşıyıcı sistemlerin kamptotesinin taşınması açısından sağladığı belli başlı üstünlükler arasında; uygulama kolaylığı, bölgeye özgü etki için lokalize ilaç taşınması ve uzatılmış salım süreleri sayılabilir. Bunlara ek olarak, daha düşük doz uygulamasından dolayı istenmeyen yan etkilerin azaltılması ve hasta uyuncunun artırılması bu sistemleri kamptotesin uygulaması açısından ümit verici konuma getirmiştir.

Bu tez kapsamında, klinik aktivitesi gösterilmiş yeni sınıf kemoterapötik moleküllerden olan kamptotesinin polimerik ve oligosakkarit bazlı olmak üzere farklı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanmıştır. Nanopartikül hazırlamada, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu oligosakkarit yapıda farklı amfifilik siklodekstrinler (6-O-Capro- $\beta$ CD,  $\beta$ -CDC6) ve polimerler (PLGA, PCL) kullanılmıştır ve yapılan deneysel çalışmalar ile siklodekstrin bazlı, ilaç yükleme etkinliği yüksek, kontrollü salım sağlayan ve toksisitesi düşük kamptotesin formülasyonları geliştirilmeye çalışılmış, ayrıca, FDA tarafından onaylı, biyoparçalanabilir polimerler olan PLGA ve PCL ile yüksek etkinlikte ve toksisiteye yol açmayan kamptotesin nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Kamptotesin suda çözünmeyen (<1 mg/mL) ve pH'ya bağlı stabilite sorunu olan bir moleküldür.

pH'ya bağımlı olarak iki formda bulunmaktadır. pH 5'in altında aktif lakton formunda iken; bazik veya fizyolojik nötral pH'da inaktif karboksilat formunda bulunmaktadır. Antikanser etkinliği çok yüksek, ancak çözünürlük ve pH'ya bağlı stabilite sorunları yönünden klinik etkinlik göstermeyen bu etkin maddenin hazırlanmaya çalışılan nanopartiküler sistemlerle enjekte edilebilir, toksik olmayan ve yüksek etkinlikteki formülasyonlarının geliştirilebilmesi durumunda literatürde bu konudaki boşluğu doldurabilmek de mümkün olacaktır. Sonuç olarak, etkinliği yüksek antikanser etkin maddenin başarılı formülasyonu, günümüzde başlıca ölüm sebeplerinden birini oluşturan bir hastalıkta yeni bir tedavi alternatifi için umut oluşturabilecektir.

Bu bölümde, tez çalışmaları boyunca sürdürülen deneysel çalışmaların ve bu çalışmalardan elde edilen bulguların değerlendirilmesi yapılacak ve bu sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılarak tartışılacaktır.

### **5.1. Kamptotesinin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi**

Tez çalışmamızda, formülasyon çalışmalarına başlamadan önce kamptotesinin fizikokimyasal özellikleri Bölüm 3.1.3.'de açıklandığı şekilde incelenmiştir. Bu amaçla, etkin maddenin UV spektrumu alınmış, DSC analizi gerçekleştirilmiş, FT-IR ve <sup>1</sup>H-NMR spektrumları çekilmiş, SEM analizleri yapılmıştır. Sonuçlar, literatür verileri ile karşılaştırılarak etkin maddenin karakterizasyonu ve saflık kontrolleri tamamlanmıştır.

Kamptotesinin UV spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir. Görüldüğü üzere, kamptotesin 370 nm dalga boyunda maksimum pik vermektedir, bu bulgu literatür bilgisi ile uyumlu bulunmuştur (195).

Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, Bölüm 3.1.3.2.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kamptotesine ilişkin DSC termogramı, Şekil 4.2'de verilmiştir. 264-267°C'de elde edilen endotermik pikin, kamptotesinin erime derecesini gösterdiği literatürde yer alan veriler ile doğrulanmıştır (176).

FT-IR spektrumunda Bölüm 4.1.3'de belirtilen karakteristik madde pikleri görülmektedir. Yapıda aromatik halkaya, alifatik yapıya, ester, karbonil, karboksilik asit gruplarına ve lakton halkasına ilişkin pikler görülmüştür. Bu sonuçlar, kamptotesinin kimyasal yapısıyla ve literatür bilgileriyle uyumlu bulunmuştur (155).

NMR spektroskopisi, özellikle karbon ve hidrojen içeren bileşiklerin yapı tayinlerinde bilgi veren en önemli tekniklerden biridir. Kamptotesinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda, farklı pozisyonlarda bulunan tüm hidrojenlerine ilişkin pikler Bölüm 4.1.4.'de belirtilmiştir. Bu bulgular, literatür bilgileri ile uyumlu bulunmuştur (168).

Kamptotesinin yüzey özellikleri, SEM ile incelenmiştir ve eksen uzunlukları birbirinden farklı olan molekülün monoklonal yapıda olduğu görülmüştür.

Kamptotesinin miktar tayini, floresans dedektör kullanılarak HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kamptotesin çözeltileri, lakton formunu elde etmek için pH 3'e, karboksilat formunu elde etmek için pH 10.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan 6 farklı konsantrasyonda çizilen kalibrasyon doğruları ve bu doğrulara ilişkin denklemler Şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Validasyon parametrelerinden regresyon katsayısı ( $r^2$ ) lakton ve karboksilat formları için sırasıyla 0.9999 ve 0.9995 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ile çalışılan aralıkta kamptotesin için elde edilen kalibrasyon doğrusunun doğrusallığı gösterilmiştir. Bu kapsamda ayrıca tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası farklılık ile analiz süresince stabilite, gözlenebilirlik sınırı ve alt tayin limiti saptanmıştır. Elde edilen değerlere ilişkin varyasyon katsayıları ile tayinin hassas ve tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmış, ayrıca formülasyonlarda kullanılacak maddelerin ve ortamların analiz esnasında birbiriyle herhangi bir girişim oluşturmadığı da Bölüm 3.1.4.2.'de anlatıldığı şekilde gösterilmiştir.

Tez çalışmalarımızda, kamptotesinin aktif lakton formu ve inaktif karboksilat formu için yaptığımız bu analitik yöntemin validasyon sonuçları değerlendirildiğinde, bilimsel güvenilirliği olan bu HPLC metodunun, kamptotesinin kantitatif miktar tayini gerektiren tüm deneysel aşamalarında kullanılabilecek bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

## 5.2. Kamptotesinin Hidroliz Kinetiğinin Belirlenmesi

Kamptotesin, fizyolojik pH'da hidrolize uğrayarak aktif lakton formundan inaktif ve toksik karboksilat formuna dönüşmektedir. Bu nedenle, etkin maddenin kendisinin fizyolojik pH'da stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla, hidroliz kinetiğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bölüm 3.1.5'de anlatıldığı şekilde yapılan hidroliz kinetiği çalışmasında, kamptotesinin PBS pH 7.4 içindeki lakton miktarı 4. saat sonunda % 20'ye düşmüştür. Bu şartlarda tez kapsamında yapılan çalışmada, kamptotesinin, 37°C'de PBS pH 7.4 ortamında yarılanma ömrü birinci derece reaksiyonlara göre hesaplanmış ve 107 dk olarak bulunmuştur.

Literatürde farklı şartlar altında kamptotesin için hidroliz kinetiği çalışmaları yapılmıştır. Ertl ve diğ. (158) tarafından yapılan bir çalışmada kamptotesinin, PBS içinde, 25°C'de yarılanma ömrü 76 dk olarak hesaplanmıştır. Chourpa ve diğ. (199) tarafından pH 7.3'de yapılan bir çalışmada ise kamptotesinin lakton formunun yarılanma ömrü  $29.4 \pm 1.7$  dk olarak bulunmuştur.

Tez çalışmalarında, siklodekstrinler ile inklüzyon kompleksleri hazırlanarak kamptotesinin stabilite probleminin çözümüne yönelik çalışmalarda ve girişimlerde bulunulmuştur. Hazırlanan komplekslerin nanopartiküllere enkapsüle edilmesiyle de in vitro salım sırasında, nanopartiküllerden kamptotesinin aktif lakton formu korunmaya çalışılmıştır.

Tyner ve diğ. (175) tarafından yapılan çalışmada ise kamptotesinin, sükroz aspartat sürfaktan misellerine katıldığı, bu misellerin daha sonra katyonik Mg-Al çift tabakalı hidroksitlerle birleştirilerek fizyolojik şartlarda stabilitesinin korunmasının başarıldığı bildirilmektedir.

## 5.3. Faz Çözünürlük Çalışmaları

Faz çözünürlük çalışmaları, inklüzyon kompleksi oluşturma ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılan temel deneysel yöntemlerden birisidir ve bu yöntem ile siklodekstrinin çözünürleştirici etkisi tayin edilmektedir.  $K_{1:1}$  değeri olarak verilen sabite, etkin maddenin siklodekstrine olan afinitesinin bir göstergesidir

ve bu değerin büyük olması etkin maddenin siklodekstrine afinitesinin yüksek bulunduğuna, dolayısıyla oluşan kompleksin dayanıklı olduğuna işaret etmektedir. Çalışmalarımızda, faz çözünürlük çalışması doğal siklodekstrinler olan HP- $\beta$ -CD ve  $\beta$ -CD ile gerçekleştirilmiştir. Doğal siklodekstrinler, konuk ilaç molekülleri ile inklüzyon kompleksi oluşturarak, onların çözünürlüklerini önemli ölçüde artırmaktadırlar (91). Amfifilik siklodekstrinlerden olan 6-O-Capro- $\beta$ CD ve  $\beta$ -CDC6'in bu çalışmaya alınmamasının nedeni bu tip inklüzyon komplekslerinden etkin maddenin çözünürlüğünün artmasının beklenmemesidir, zira, bu komplekslerin asıl amacı kendiliğinden nanopartikül oluşturmalarıdır (117).

Bu tez kapsamında Bölüm 3.1.6'da anlatıldığı şekilde yapılan faz çözünürlük çalışmasında, kamptotesinin HP- $\beta$ -CD için  $K_{1:1}$  değeri  $233.75 \text{ M}^{-1}$  bulunurken  $\beta$ -CD için  $138.89 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değerler karşılaştırıldığında, kamptotesinin HP- $\beta$ -CD'e olan afinitesinin daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir, bu nedenle de deneysel çalışmalarda doğal siklodekstrin olarak HP- $\beta$ -CD kullanılmasına karar verilmiştir. HP- $\beta$ -CD ve  $\beta$ -CD için faz çözünürlük diyagramları  $A_L$  şeklinde bulunmuştur. Bu diyagram bize, siklodekstrin konsantrasyonuna bağlı olarak etkin maddenin çözünürlüğünün doğrusal olarak artırdığını göstermektedir.

#### 5.4. Hazırlanan Komplekslerin Karakterizasyonu

Ev sahibi moleküller olarak davranan siklodekstrinler, hidrofobik kavimleri içerisine apolar molekülleri hapsedme ve dolayısı ile konuk moleküllerin sudaki çözünürlüğü, çözünme hızı, stabilitesi gibi fizikokimyasal karakteristiklerini modifiye etme yeteneğine sahiptirler (90). Bu nedenle, etkin maddenin siklodekstrinler ile inklüzyon komplekslerinin hazırlandığını tespit edebilmek için elde edilen komplekslerin fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir (95). Bu tez çalışması kapsamında, suda çözünürlük ve stabilite problemi olan kamptotesinin amfifilik siklodekstrinlerden 6-O-Capro- $\beta$ CD ve  $\beta$ -CDC6 ile; doğal siklodekstrinlerden HP- $\beta$ -CD ile 1:1 molar oranlarda inklüzyon kompleksleri hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Hazırlanan komplekslerin karakterizasyon çalışmaları, Bölüm 3.1.8'de anlatıldığı şekilde FT-IR spektrumu,  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu, DSC ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan komplekslere

ilişkin bulgular; kamptotesin, siklodekstrinler ve kamptotesin ile siklodekstrinlerin komplekslerdeki miktarlarının basit olarak karıştırılması ile hazırlanan fiziksel karışımları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Etkin madde ile siklodekstrin arasındaki etkileşimin değerlendirildiği önemli bir yöntem olan FT-IR spektroskopisi ile, inklüzyon kompleksleri içindeki kamptotesine ilişkin IR bantlarının şiddetinde değişiklikler gözlenmiştir (82). Kompleks içindeki etkin maddenin karakteristik spektrumlarındaki küçülme veya kaybolma kamptotesinin serbest halde kalmadığını veya çok az sayıda molekülün serbest olarak kaldığını göstermektedir. Inklüzyon kompleksi oluşumu sonucu, kamptotesine ilişkin FT-IR spektrumunda görülen değişiklikler şu şekilde özetlenebilmektedir:

- 1600–1500  $\text{cm}^{-1}$ 'de aromatik halkaya ilişkin C=C rezonans çifte bağ gerilim bantları,
- 1600–1700  $\text{cm}^{-1}$ 'de yapıya özgü aromatik halka bantları,
- 1760  $\text{cm}^{-1}$ 'de lakton piki

kaybolmuştur. Bantlarda görülen bu farklılıklar, oluşan komplekslerin etkin maddeden daha farklı kimyasal yapıya sahip olduklarını gösterirken, etkin maddenin karakteristik spektrumlarındaki kaybolmalar da etkin maddenin serbest halde bulunmadığını göstermektedir. Bu durum bize, inklüzyon kompleksinin başarı ile hazırlandığına işaret etmektedir. Ayrıca, piklerde gözlenen bu kayma ve değişiklikler etkin madde ve siklodekstrinler arasında kimyasal bir etkileşim olduğu şeklinde de yorumlanabilmektedir.

$^1\text{H-NMR}$  spektroskopisi, inklüzyon kompleksleri hakkında önemli bilgiler veren yöntemlerden birisidir. Inklüzyon kompleksi oluşumu sonrası, konuk ilaç molekülleri kavite içerisine girdikleri zaman, kavitenin iç kısmındaki H-3 ve H-5 protonlarına ilişkin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarında kayma gözlenirken; siklodekstrin kavitesinin dış kısmında yer alan H-1, H-2 ve H-4 protonları bu durumdan etkilenmemektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, kamptotesin ile kompleks oluşumu sonrası 6-O-Capro- $\beta\text{CD}$ ,  $\beta\text{-CDC6}$  ve HP- $\beta\text{-CD}$  spektrumunda, H-3 ve H-5 protonlarına ilişkin sinyallerde kaymalar olduğu gözlenmiştir. Bu da kamptotesinin

siklodekstrin kavitesine girdiği, dolayısıyla inklüzyon kompleksi oluştuğu anlamına gelmektedir.

İnküzyon komplekslerinin termal davranışları, DSC analizi ile değerlendirilmiştir. DSC analizi, fiziksel karışımların ve etkin madde:siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan ve sistem içerisinde etkin madde molekülünün serbest veya bağlı durumda bulunduğunu gösteren bir tekniktir. Komplekslerde etkin maddenin erime pikinin kaybolması, ortamda serbest halde bulunmadığını göstermektedir. İnküzyon komplekslerine ilişkin DSC termogramlarında, 264-267°C'de görülen kamptotesine ilişkin erime endoterminin tamamen kaybolduğu görülmektedir. Bu sonuç, ortamda kamptotesinin serbest kristal halde bulunmadığını açıklamaktadır. Yine aynı şekilde, inklüzyon komplekslerine ilişkin piklerin fiziksel karışımdan farklı olması komplekslerin başarı ile hazırlandığını göstermektedir. Liyofilizasyon işlemi, kamptotesinin kristal özelliklerini değiştirmiş ve erime pikini maskeleymiş olabilir. İnküzyon kompleksi oluşturulurken kullanılan kolyofilizasyon prosedüründe, kamptotesin absöü alkolde çözüdüürülmüş, iki katı hacimdeki distile su içine ilave edilmiş, karıştırılmış ve organik çözücü rotovaporda uçurulduktan sonra liyofilize edilmiş ve kamptotesin katı toz halde elde edilmiştir. Böylece kristal değişikliğine bağlı erime pikinin maskelenme olasılığı ortadan kaldırılmıştır.

Kamptotesin, HP- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CDC6, 6-O-Capro- $\beta$ CD ve hazırlanan komplekslerin kristal yapıları, SEM analizi ile Bölüm 3.1.8.3'te anlatıldığı şekilde incelenmiştir. SEM görüntüleme tekniği ile incelemeler sonucunda, kamptotesinin monoklonal,  $\beta$ -CDC6'nın hegzagonal, HP- $\beta$ -CD'in amorf, 6-O-Capro- $\beta$ CD'in küresel yapıda olduğu hazırlanan komplekslerin ise planar (düzlemsel) yapıda oldukları izlenmiştir. Komplekslerin farklı kristal yapıda olması, onların karakteristik özelliklerinin etkin maddeden ve siklodekstrinlerden farklı olduğunu göstermektedir. Komplekslerde, ayrıca, kompleksleşmemiş kristalize serbest kamptotesin yapıları mevcut değildir.

Bütün bu yöntemler kompleks oluşumunun gösterilmesi açısından, birbirlerini doğrulamak veya desteklemek amacıyla kullanılmıştır. Bu analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise, kamptotesinin doğal ve amfifilik siklodekstrinlerle

inklüzyon komplekslerinin başarıyla hazırlandığı sonucuna ulaşmak mümkündür. Sonuç olarak, bu bulgular bize, kamptotesinin siklodekstrin kavitesi içerisine girdiğini ya da uzun alkil zincirlerinin arasında hapsoldüğünü göstermektedir.

### 5.5. Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Literatürde yapılan çalışmalarda, amfifilik siklodekstrin moleküllerinin kendi kendine bir araya gelerek nanopartiküler kolloidal taşıyıcı sistem oluşturdukları bildirilmiştir (104, 119). Amfifilik siklodekstrinler ile nanoküre ve nanokapsüllerin hazırlanmasında nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak, sürfaktan içermeyen durumda bile nanopartiküllerin kendiliğinden oluştuğu birçok çalışmada gösterilmiştir (104, 119, 120, 124). Literatürde, nanopresipitasyon yöntemi (74, 200) ve emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri (75) ile primer veya sekonder yüzü modifiye edilmiş amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin türevleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır.

Nanopartikül hazırlamada, farklı amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin türevleri kullanılmış olup, ağırlıklı olarak çalışmalarda primer yüzü modifiye edilmiş amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin olan 6-O-Capro- $\beta$ CD ve sekonder yüzü modifiye edilmiş amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin  $\beta$ -CDC6 üzerinde çalışılmıştır. Bu türevlerin kullanılmasının nedenleri olarak nanoküre ve nanokapsül hazırlamada yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmaları, hazırlama esnasında herhangi bir sürfaktana ihtiyaç duyulmadan nanopartiküllerin inklüzyon kompleksinden hareketle direkt olarak hazırlanabilmeleri ve geciktirilmiş ani salım (*burst effect*) sağlayabilmeleri sıralanabilir. Çalışmalarımızda, doğal bir siklodekstrin olan HP- $\beta$ -CD kullanılarak hazırlanan komplekslerden hareketle, PLGA ve PCL polimerleriyle nanopresipitasyon metoduna göre polimerik nanopartiküller hazırlanmıştır. PLGA ve PCL polimerleri biyoparçalanır, biyoyumlu ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı olmalarından dolayı, tez çalışmamızda geliştirilecek nanopartikül formülasyonlarında kullanılmak üzere seçilmiştir. PLGA'nın asidik mikroikliminin, sağladığı düşük pH ile kamptotesinin aktif lakton formunda bulunmasını sağlaması açısından büyük üstünlük oluşturduğu düşünülmektedir (170).

Amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanoküreleri ilk kez Skiba ve diğ. (201) tarafından hazırlanmış ve bu konudaki çalışmaları patentlenmiştir. Yapılan bu çalışmalarda,  $O_2$  ve  $O_3$  pozisyonlarına farklı uzunluklarda (C2'den C14'e) açıl grupları eklenmiş sekonder yüz modifiye  $\beta$ -siklodekstrinler sentezlenerek, nanopresipitasyon yöntemi ile etkin madde yüklü veya boş nanoküreler hazırlanmıştır. Amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanokürelere yüklenen diğer ilaç molekülleri arasında, progesteron (104), bifonazol, klotrimazol (202), hidrokortizon, progesteron, testosteron ve doksorubisin HCl (104) yer almaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, modifikasyon için eklenen farklı uzunluktaki açıl gruplarının ve kullanılan sürfaktan türünün, nanokürelerin partikül boyutu, fizikokimyasal özellikleri ve stabilitesi üzerine etkileri incelenmiştir (106, 124, 201).

Amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanokürelerinin pH 1-11 arasında fiziksel stabilitesinin iyi olması nedeni ile bu formülasyonların oral, oküler ve i.v. uygulamalar için uygun olduğu literatürde belirtilmektedir (106).

Memişoğlu-Bilensoy ve diğ. (110) tarafından yapılan çalışmada, kemoterapötik etkili etkin madde içeren amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanoküre ve nanokapsüllerine ilişkin çalışmaların ve konuya ilginin arttığı görülmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, nanopartikül hazırlamada farklı siklodekstrin türevleri kullanılmış ise de, çalışmaların ağırlıklı olarak 6-O-Capro- $\beta$ CD ve  $\beta$ -CDC6 üzerinde yoğunlaştığı dikkat çekmektedir (70, 110, 117, 123, 124).

Bilensoy ve diğ. (118) tarafından amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanopartikülleri kontrollü salım özellikleri göstermekte olup, bu nanopartiküllerle kemoterapötik etkili tamoksifen sitratla altı saate kadar ve paklitakselle ise kırksekiz saate kadar uzatılmış salım profilleri elde edilmiştir. Aynı araştırmacı tarafından hazırlanan, tamoksifen sitrat içeren  $\beta$ -CDC6 nanopartiküllerine ilişkin olarak in vitro karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş ve pozitif meme kanseri tedavisinde ümit veren bir sistem olabileceği gösterilmiştir (123).

Bilensoy ve diğ. (123) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, yine kemoterapötik bir etkin madde olan paklitaksel yüklü 6-O-Capro- $\beta$ CD nanoküre ve nanokapsülleri hazırlanmış ve bu formülasyonlar ile etkin maddede rekristalizasyona rastlanmadığı gösterilmiştir. Bu önemli bir bulgudur, zira, paklitaksel uygulaması ile

ilgili en ciddi problemlerden birisinin maddenin sulu ortamda rekrystalize olarak çökmesi olduğu bilinmektedir. Böylece, paklitakselin ticari preparatında bulunan yardımcı çözücüye bağlı ciddi toksisite ve yan etki ise amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanopartikülleri ile formüle edilerek giderilmeye çalışılmıştır. Nanopartiküllerdeki düşük toksisite L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde yapılan çalışma ve insan kanında yapılan hemoliz deneyleri ile gösterilmiş ve taşıyıcı sistemin ticari piyasada bulunan sisteme göre belirgin derecede düşük toksisite gösterdiği de kanıtlanmıştır.

Kemoterapide, EPR etkisi ile ilaç hedeflendirmede, polimerik ilaç taşıyıcı sistemler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla, kullanılan polimerler arasında PLGA ve PCL önemli bir yer tutmaktadır. PLGA, FDA tarafından insanlarda terapötik kullanım için onaylanmış, biyoparçalanır ve biyouyumlu bir polimerdir. Farklı ilaçların (hidrofobik ve hidrofilik) yüklenmesine olanak sağlayan çeşitli tekniklerle hazırlanma olanağı vardır. PLGA ile istenilen büyüklükte ve dayanıklı nanopartiküller elde edebilmek için sürfaktan kullanımı gereklidir. PCL ise, biyoparçalanır yapıda hidrofobik bir polimerdir ve farklı hazırlama teknikleri kullanılarak nanopartiküller hazırlanabilir. İlk olarak, steroidlerin ve narkotik analjeziklerin kontrollü salımında kullanılmıştır. Ayrıca, parenteral ve implantasyon yoluyla kullanımı vardır ve FDA tarafından implante sistem eksipiyanı olarak onaylanmıştır (37, 43).

Nanopresipitasyon metoduyla nanopartikül hazırlama, ilk olarak Fessi ve diğ. (69) tarafından kullanılmıştır. Bu teknik hızlı ve kolaydır, nanopartiküller tek basamakta kendiliğinden oluşmaktadır. Hazırlamada birbiriyle karışmayan iki çözücüye ihtiyaç vardır. Polimerin ve etkin maddenin organik çözücüde çözünmesi istenirken, sulu fazda çözünmemesi tercih edilmektedir. Polimer çözeltisi sulu faza eklenince, organik çözücünün ortamdaki hızlı biçimde uzaklaşması istenmektedir. Etkin madde enkapsülasyonu için polimer çözeltisi, dispersiyon ortamına kolayca difüze olmalıdır. Bu metod ile, düşük polidispersite indeksli uygun partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller (100–300 nm) elde etmek mümkündür. Enjekte edilebilir nanopartiküller taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, partikül büyüklüğünün, sistemin etkinliğini etkileyen en önemli parametrelerden birisi olması nedeniyle, partikül büyüklüğü uygun boyutta (<400 nm) olan ve bu şekilde makrofaj alımı azaltılarak kan dolaşımında kalma süreleri uzatılmış ilaç taşıyıcı sistemlerin

geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Polidispersite indeksi, partikül büyüklüğü dağılımı hakkında bilgi veren bir parametredir ve 0.2'nin altında görülen polidispersite indeksi değerleri, homojen nanopartikül dispersiyonlarının oluştuğuna işaret etmektedir. Bu yöntem ile nanoküre hazırlamada, PLGA, selüloz türevleri, PCL gibi geniş grup polimerlerle çalışılabilir, ayrıca, bu metod gelişmiş karıştırma tekniği, sonikasyon veya yüksek sıcaklık gerektirmemektedir. Hatta, her zaman sürfaktana ihtiyaç duyulmayabilir ve en önemlisi toksik organik çözücü kullanma gereği bulunmamaktadır ve bu teknik hidrofobik etkin maddeler için daha uygun bulunmaktadır. Suda az çözünen; etanol, aseton gibi organik çözücülerde çözünen maddelerle de % 100 oranlarında enkapsülasyon etkinliğine ulaşılabilir (40, 74). Son yıllarda, suda çözünen ilaçlarla yapılan çalışmalarla da umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Prokain hidroklorür ile yapılan bir çalışmada (177) dış faz pH'sı ayarlanarak etkin maddenin iyonizasyonu azaltılmış ve su fazına kaçıışı engellenerek enkapsülasyonu sağlanmıştır. Yoo ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada (203) orijinal metod modifiye edilerek lizozim enkapsüle edilmiştir. Bu çalışmada, protein ve polimer (PLGA) içeren DMSO çözeltisi, poloksamer 407 içeren sulu faza ilave edilmiştir. Bu yöntemde etanol, aseton gibi sık kullanılan çözücüler dışında bir çözücü kullanılarak daha hidrofilik etkin maddeler için yeni bir yol açılmıştır.

## **5.6. Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Bu bölümde, hazırlanan nanopartikül formülasyonları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları ve sonuçları değerlendirilecektir. Bu amaçla, partikül büyüklüğü ve dağılımı analizi, zeta potansiyel ölçümü, SEM ve AFM analizleri, nanopartiküllere yüklenen kamptotesin miktarı tayini ve in vitro salım deneyleri tartışılmıştır.

### **5.6.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı**

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü analizi, Bölüm 3.1.9.3.1'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Partikül büyüklüğü, yarı elastik ışık saçılması yöntemi (QELS) ile 173°C'lik saçılma açısı kullanılarak tespit edilmiştir. Bu yöntem ile partikül büyüklüğü analizi, partiküllerin, dispersiyon ortamını oluşturan moleküller tarafından

bombardımanından kaynaklanan Brown hareketlerinin partikül büyüklüğü ile ilişkilendirilmesine dayanmaktadır, genellikle, partikül boyutundaki ve ortam viskozitesindeki artışa bağlı olarak, partiküllerin hızında azalma görülmektedir.

Bilindiği üzere, enjekte edilebilir nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonlarında partikül büyüklüğü, sistemin etkinliğini belirleyen önemli parametrelerden birisidir. CPT: $\beta$ -CDC6 kompleksiyle hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri 142 nm, CPT:6-O-Capro- $\beta$ CD nanopartikülleri için 271 nm, PLGA ve PCL nanopartikülleri için ise sırasıyla 187 nm ve 274 nm olarak bulunmuştur. Boş nanopartiküllerin ve kamptotesin yüklü nanopartiküllerin partikül büyüklükleri incelendiğinde, nanopartiküllere etkin madde yüklenmesiyle partikül büyüklüklerinin arttığı görülmüştür. Bu durumun nedeni, yüksek yükleme sonucu hem amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin kavitesi içerisinde, hem de hidrofobik alkil zincirlerine takılmış şekilde bulunan kamptotesin moleküllerinin partikül büyüklüğü artışına yol açmasıdır. Etkin madde molekülü, amfifilik siklodekstrin içine girdiği zaman uzun alkil zincirlerinin yönünü ve esnekliğini değiştirmektedir. Konuk ilaç moleküllerinin bulunması, amfifilik siklodekstrinin yüzey alanını artırmakta ve bu etki de arayüzeydeki amfifilik siklodekstrinin uzun alkil zincirlerinin duruş özelliğini etkilemektedir. Ön yükleme tekniği ile, amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin molekülüne ilaç asosiyasyonu esas olarak matriks içerisinde dispersiyon yolu ile gerçekleşirken, yüksek yükleme sonucu hem matriks dispersiyonu hem de yüzeye adsorpsiyon gözlenmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllere etkin madde enkapsüle edilmesi partikül büyüklüğünde artışlara neden olmaktadır. Bu veriler, daha önce amfifilik siklodekstrin molekülleriyle çalışan araştırmacıların bulguları ile örtüşmektedir (104, 119).

Partikül büyüklüğü ayrıca, nanopartiküllerin filtrasyonla sterilizasyonu açısından da önem taşımaktadır. Bu açıdan düşünüldüğünde, CPT: $\beta$ -CDC6 ve PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri filtrasyonla sterilizasyon için uygun bulunurken, CPT:6-O-Capro- $\beta$ CD ve PCL ile hazırlanan nanopartiküller ise boyutları nedeniyle, filtrasyon sterilizasyonu için uygun bulunmamıştır. Ayrıca, hazırlanan nanopartiküller, söz konusu parametreler için, enjekte edilebilirlik açısından da uygun bulunmuştur. Polidispersite indeksi düşük olan formülasyonlar,

partikül büyüklüğü açısından homojen olan dağılımlardır. Tez kapsamında hazırlanan kamptotesin yüklü nanopartiküllerin düşük polidispersite indeksli, uygun partikül büyüklüğüne sahip formülasyonlar (150-300 nm arası) oldukları gösterilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin RES'den kaçışı, bu nanopartiküllerin hedef doku ya da organa ulaşabilmesi açısından önemlidir, bilindiği gibi partikül büyüklüğü 400 nm'nin altındaki moleküller RES'den kaçabilmekteyse de (118), 200 nm'nin altına inildiğinde RES'den kaçış daha kesin olabilmektedir, çalışmamızda, bu gerekçe göz önüne alınarak, kan dolaşımında uzun süre kalabilen nanopartiküllerin hazırlanması hedeflenmiştir.

Tümör kan damarlarının, hızlı bir şekilde çoğalan endotel hücrelere, bağ dokusu eksikliğine, bozulmuş membran oluşumuna sahip olduğu bilinmektedir (204). Tümör hücrelerinin, oksijene ve besinlere olan artan ihtiyacı sonucu, vasküler sisteminin geçirgenliğinde artış gözlenmektedir ki, tümör hücrelerinde gözlenen bu duruma, artan geçirgenlik ve tutulma etkisi (EPR - enhanced permeability and retention effect) adı verilmektedir. Bu hücrelerin, artmış oksijen ve besin ihtiyacına bağlı olarak, hücreleri çevreleyen vasküler sistemde görülen EPR etkisi, küçük nanopartiküllerin tümör bölgesine daha hızlı penetre olabilmelerini sağlamaktadır (205).

Partikül büyüklüğü ve yüzey alanı toksikolojik açıdan da önemli özelliklerdendir, zira partikül büyüklüğü küçüldükçe yüzey alanı büyümektedir. Bu durum da, atom ve moleküllerin iç kısımdan çok yüzeyde toplanmasına neden olmaktadır, yüzey alanı arttıkça partikülün yüzeyindeki potansiyel reaktif grupların sayısı da yani, toksikolojik etkilere yol açabilecek grupların sayısı artmaktadır (206). Bu nedenlerle, nanopartiküllerde partikül büyüklüğünün gereksiz küçültülmesi güvenilirlik açısından istenmeyen bir durum olarak düşünülmektedir.

### **5.6.2. Zeta Potansiyel Ölçümü**

Nanopartiküllerin zeta potansiyel analizleri, Bölüm 3.1.9.3.2.'te anlatıldığı şekilde yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.8'de sunulmuştur. Kolloidal sistemdeki her partikülün etrafında elektriksel bir çifte tabaka bulunmaktadır. Zeta potansiyel, bu

çifte tabakanın dış kısmında yer alan difüzyon tabakasındaki elektriksel potansiyel değerini açıklamaktadır. Malvern zetasizer ile elektriksel alan içerisinde bulunan yüklü partiküllerin elektroforetik hareketliliği, lazer dopler elektroforez yöntemi ile ölçülebilmektedir.

Partiküler sistemlerin yüzey yükü, genellikle zeta potansiyel ölçümü ile tespit edilmektedir. Zeta potansiyel analizleri; koloidal stabilitenin değerlendirilmesi ve in vivo uygulamalarda partikülün sahip olduğu yüzey yükünün önemi nedeniyle incelenmelidir ve ölçülen yüzey yükünün değeri, partikülün uzun süreli stabilitesinin tahmini için önemli bulunmaktadır. Bir süspansiyon içindeki partiküllerin sahip olduğu yüksek pozitif veya negatif zeta potansiyel değerleri, partiküllerin birbirini itmesi ile sonuçlanmakta ve bu durum partiküllerin bir araya gelme eğilimine engel olmaktadır. Diğer bir deyişle, partiküllerin düşük zeta potansiyel değerlerine sahip olması, partiküllerin bir araya gelmesini engelleyecek kuvvetin ortadan kalkması ve partiküllerin flokülasyonu ile sonuçlanmaktadır (207).

Yüzey yükü, nanopartiküllerin dayanıklılığı açısından olduğu kadar biyolojik dokularla etkileşmesi ve hücre içine alınması açısından da önemlidir. Nanopartiküllerin yüzey özellikleri, makrofajlar tarafından fagosite edilme özelliklerini etkilemektedir. Sıfıra yakın zeta potansiyeli olan partiküllerin fagositoz ile alımı yüklü partiküllere, özellikle, pozitif zeta potansiyele sahip partiküllere kıyasla daha azdır.

Çalışmalarımızda, kamptotesin yüklü  $\beta$ -CDC6 nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri -22, standart sapması 0.7; 6-O-Capro- $\beta$ CD nanopartiküllerinin ise zeta potansiyelleri -13, standart sapması 0.9 olarak bulunmuştur. PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri ise -0.06, standart sapması 1; PCL ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri -19, standart sapması 0.2 olarak bulunmuştur.

Durum, hücre içine alınması açısından değerlendirildiğinde, 6-O-Capro- $\beta$ CD,  $\beta$ -CDC6 ve PCL nanopartikülleri negatif yüklü olduğu için, PLGA nanopartikülleri ise sıfıra yakın yükte olduğu için zeta potansiyel değerleri açısından uygun bulunmuştur.

### 5.6.3. Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

#### 5.6.3.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve Atomik Güç Mikroskop (AFM) Analizi

Hazırlanan nanopartiküllerin Bölüm 3.1.9.3.3.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen SEM ve AFM incelemelerinde, tüm örneklerdeki partiküllerin küresel ve düzgün yüzeyli oldukları görülmüştür. SEM fotoğrafları çekimi sırasında uygulanan yüksek elektron bombardımanı, siklodekstrinlerin yapısına zarar verdiği için görüntülerin netlikleri beklenen düzeyde olmamıştır.

#### 5.6.4. İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Kamptotesinin nanopartiküllere hapsolma karakteristikleri; hapsolan ilaç miktarı ( $\mu\text{g}$ ), asosiye ilaç yüzdesi ve hapsolma etkinliği ( $\mu\text{g}$  ilaç/ $\text{mg}$  siklodekstrin) açısından valide edilmiş bir HPLC metodu (VK<2) kullanılarak Bölüm 3.1.9.4'de belirtildiği şekilde değerlendirildiğinde, yüksek yükleme tekniği ile hazırlanmış amfifilik  $\beta$  siklodekstrin nanopartiküllerinin yükleme etkinliğinin, polimerik nanopartiküllere göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışmalarımızda kullanılan amfifilik siklodekstrinler uzun alifatik zincirlere sahiptir ve bu alifatik zincirler sayesinde, amfifilik siklodekstrinler doğal siklodekstrinlere kıyasla hidrofobik etkin maddelerle etkileşimde bulunacak hidrofobik bölgelere sahip olmaktadır, bu nedenle de, inklüzyon kapasitelerinin artırıldığı düşünülmektedir.

DeneySEL çalışmalarımızda hazırlanmış olduğumuz nanopartiküllere yüklenen kamptotesin miktarı, CPT: $\beta$ -CDC6 nanopartikülleri için 28  $\mu\text{g}$  (hapsolma etkinliği % 32, % asosiye ilaç % 9); CPT:6-O-Capro- $\beta$ CD için 48  $\mu\text{g}$  (hapsolma etkinliği % 57, % asosiye ilaç % 13) olarak hesaplanmıştır. Suda çözünürlüğü az olan kamptotesin için siklodekstrinlerle kompleks oluşturularak ve yüksek yükleme tekniği kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerde ilaç yükleme etkinliğinin artırıldığı, hazırlama sırasında ilaç kayıplarının azaltıldığı görülmektedir. İlaç yüklemesi üzerine etki eden en önemli faktörün yükleme tekniği olduğu, yapılan bazı çalışmalarda

araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (119, 120). Yüksek yükleme tekniği ile nanopartikül hazırlama esnasında aşırı miktarda ilaç ortamda bulunduğu için daha fazla ilacın hapsedilmesi sağlanmaktadır.

Genel olarak, amfifilik  $\beta$  siklodekstrin nanopartiküllerinde etkin madde yükleme etkinliğini belirleyen parametreler şu şekilde belirtilmiştir (119):

- Amfifilik siklodekstrinin kimyasal yapısı
- Yükleme tekniği
- Etkin maddenin siklodekstrine olan intrinsik afinitesi
- Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri (elektrik yükü, hidrofilik / lipofilikliği gibi)

Tez alışmalarımızda, PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerde hapsolan kamptotesin miktarı 13  $\mu\text{g}$  (habsolma etkinliği % 6.6, % asosiye ilaç % 2.6); PCL ile hazırlanan nanopartiküllerde hapsolan kamptotesin miktarı 7  $\mu\text{g}$  (habsolma etkinliği % 3.6, % asosiye ilaç % 1.4) olarak bulunmuştur.

Sonuçlar göstermektedir ki, primer yüz modifikasyonu yapılmış 6-O-Capro- $\beta$ -CD nanopartiküllerine yüklenen ilaç miktarı,  $\beta$ -CDC6 nanopartiküllerine göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. 6-O-Capro- $\beta$ CD molekülünde primer yüz modifikasyonu gerçekleştirilerek, kavitenin geniş tarafı olan sekonder yüzü, kamptotesin molekülünün girişi için açık bırakılmıştır. Bu sonuçlar, sekonder yüzün modifiye edilmeden bırakılması ile sterik engelin azaltılması ve geniş bölmedeki kavitenin kamptotesinin kısmen veya tamamen girişi için açık bırakılması ile açıklanabilir. Diğer taraftan, polimerik nanopartiküllerin HP- $\beta$ -CD kompleksinden hareketle hazırlanması, ilaç yükleme etkinliğinde azalmaya yol açmıştır. Bu durum, kullanılan HP- $\beta$ -CD inklüzyon kompleksi ile kamptotesinin sudaki çözünürlüğünün artırılmış olması ve nanopartikül hazırlama sırasında etkin maddenin dış sulu faza kaçışını artırarak, enkapsülasyon oranını düşürmesi şeklinde açıklanabilir.

PLGA nanopartiküllerinde PCL nanopartiküllerine kıyasla daha fazla ilaç yüklenmesi gerçekleştirilebilmiştir, bu durumun PLGA'nın PCL'ye göre daha hidrofilik karakterde olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Literatürde, kamptotesin ile hazırlanan nanopartiküler sistemler incelendiğinde benzer ilaç yükleme değerlerine rastlanmıştır. Kamptotesin ile yüklü nanopartikülerin enkapsülasyon etkinliğinin genellikle % 10-40 arasında bulunduğu tespit edilmiştir (173, 178).

### 5.6.5. Nanopartiküllerden Kamptotesinin İn Vitro Salımı

Literatürde, nanopartiküler sistemlerden kamptotesine ilişkin salım çalışmalarında genellikle salım ortamı olarak PBS pH 7.4 kullanıldığı ve deneylerin yatay çalkalayıcı su banyosunda 37°C'de gerçekleştirildiği görülmüştür. Bu çalışmalardan çoğunda sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak sink koşulların sağlanması amaçlanmıştır (155, 158, 161).

Tez çalışmalarımızda, % 0.1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 salım ortamı içerisinde, sink koşullar altında, farklı nanopartikül formülasyonlarından kamptotesinin in vitro salım profilleri Bölüm 3.1.9.5.'te açıklandığı şekilde elde edilmiştir ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır; formülasyonlar arasında en uzun süreli salım, amfifilik siklodekstrin inklüzyon kompleksinden hareketle hazırlanan yüksek yüklü nanopartikül formülasyonlarında, en kısa süreli salım ise polimerik nanopartikül formülasyonlarında gözlenmiştir ve yapılan istatistiksel inceleme sonucu, nanopartiküllerden salınan kamptotesinin salım kinetiğinin Higuchi kinetiğine uygunluk gösterdiği anlaşılmıştır. Bilindiği üzere, Higuchi kinetiği matriksten etkin madde salımını öngören bir kinetik modeldir.

CPT:β-CDC6 kompleksi kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden kamptotesin salım grafiği Şekil 4.31'de verildiği gibidir. Bu profile göre, ilk beş saat içinde etkin maddenin % 50'si salınırken, 24. saat sonunda aktif formun % 81'i, 72. saat sonunda ise % 95'i salınmıştır.

Salım verilerine göre, 6-O-Capro-βCD nanopartiküllerinde ilk beş saat içinde kamptotesinin % 30'u, 24. saat sonunda % 48'i, 144. saat sonunda ise % 100'ü salınmıştır.

PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin salım grafiği incelendiğinde, ilk bir saat içinde etkin maddenin % 50'si, 48. saat sonunda % 100'ünün salındığı görülmüştür.

PCL nanopartiküllerinde ise ilk üç saat içinde etkin maddenin % 70'i salınırken, 24. saat sonunda kamptotesinin aktif formunun tamamı salınmıştır.

Çalışmalarımızda, tüm formülasyonlar için, in vitro salım süresi boyunca kamptotesinin aktivitesinin korunduğu ve ortamda stabil bulunduğu gösterilmiştir.

İnklüzyon kompleksinden hareketle hazırlanan nanopartiküllerden salım, nanopartikül yüzeyine adsorbe olan etkin maddenin ve nanopartikülün matriks yapısındaki etkin maddenin salımı kadar siklodekstrin kavitesi içerisine hapsolmuş olan etkin maddenin zamana bağımlı olarak inklüzyon kompleksinin kavitesinden salım ortamı ile yarışmalı yer değiştirmesi ile olmaktadır (110). Amfifilik siklodekstrinlerin modifikasyon bölgelerinin etkin madde salımını büyük ölçüde etkilediği bilinmektedir.  $\beta$ -CDC6 nanopartiküllerinden kamptotesin salımı, 6-O-Capro- $\beta$ -CD nanopartiküllerine göre iki kat daha hızlı olmuştur,  $\beta$ -CDC6 nanopartiküllerinden ilacın % 50'si beş saatte salınırken, aynı orandaki salım 6-O-Capro- $\beta$ -CD nanopartiküllerinden yirmidört saatte olmuştur. Yine, bu modifikasyon bölgelerinin oluşturduğu sterik engelden dolayı amfifilik siklodekstrinlerden etkin madde salımının polimerik nanopartiküllere kıyasla daha uzun sürede tamamlandığı tespit edilmiştir.

PLGA nanopartiküllerinden salım, PCL nanopartiküllerine göre daha yavaş ve uzun sürede gerçekleşmiştir. Polimerik nanopartiküllerden etkin madde salımını, kamptotesin-polimer etkileşimi ile polimerlerin hidrofobikliğin etkilediği düşünülmektedir.

Siklodekstrin nanopartiküllerinde etkin maddenin hem siklodekstrin kavitesine hem de nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olmasından dolayı salım bifazik olmaktadır. İlk aşamada, yüzeye yakın olan ya da yüzeyde yer alan etkin maddenin salım ortamına geçmesiyle ani salım görülmekte, takiben, kontrollü ilaç salımı olmaktadır. Literatürde, amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerinden etkin madde salımının esas olarak etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olduğu bildirilmiştir(120).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kamptotesinin ani salım etkisi göstermemesi nanopartiküllerin hedef dokuya ulaşmaya kadar ilacın önemli miktarını kaybetmeyeceğine işaret etmektedir, bu da, ilacın hedef bölgeye etkin biçimde taşınması açısından önemli olacaktır. İmplant edilebilen sistemlerde ise etkin madde hedef bölgeye en yakın konuma yerleştirildiği için bu şekilde bir taşınmaya ihtiyaç duyulmamaktadır. Tezimiz sırasında geliştirilen siklodekstrin nanopartikülleri ile kamptotesin salımı literatürde yer alan önceki çalışmalara kıyasla uzatılmış durumdadır.

Kunii ve diğ. (173,178) tarafından yapılan çalışmalarda, kitosan ve PLA/(PEG-PPG-PEG) nanopartikülleriyle kamptotesin salımının sırasıyla 80 ve 24 saat sürdüğü gösterilmiştir. Tyner ve diğ. (175) tarafından yapılan çalışmada, kamptotesin yüklü nanohibritlerde ise etkin maddenin suda çözünürlüğünün az olması nedeniyle salım 60 günde tamamlandığı bildirilmektedir.

Ertl ve diğ. (158) tarafından yapılan çalışmada, kamptotesin yüklü PLGA mikrokürelerinden ilaç salımı bifazik model oluşturmuştur. İlacın % 20-35'lik kısmı ani salım etkisi oluştururken, ardından % 40-75'lik kısmı 160 saatlik sürede salınmıştır. Tong ve diğ. (155) yaptığı çalışmada ise yine PLGA mikrokürelerinden kamptotesin onbeş günde % 100'e yakın oranda salınmıştır (155). Mikroküre formülasyonlarından salım, nanopartikül formülasyonlarına göre daha uzun sürede tamamlanmaktadır. Genellikle, nanopartikül formülasyonlarından ilaç salımı yüzey alanlarının daha geniş olması nedeniyle, birkaç saat içinde gerçekleşmektedir (110).

#### **5.6.6. L-929 Fare Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksisite Testi**

Kamptotesin içermeyen  $\beta$ -CDC6, 6-O-Capro- $\beta$ CD, PLGA ve PCL nanopartiküllerin ve kamptotesinin DMSO'daki çözeltisinin hücre canlılığı üzerine etkisi çalışmaları Bölüm 3.1.9.6'da belirtildiği şekilde, nanopartikül formülasyonlarının sitotoksisitesinin taşıyıcı sistemden kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek için yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, boş nanopartiküllerin 1:128 dilüsyonda L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği bulunmuştur. Hücre canlılık oranlarının tespitinde boyama

yönteminden başka metabolik aktivite tayini, kırılma indeksi incelemesi gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

Nanoformülasyonların, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması durumunda, genellikle, taşıyıcı sisteme yüklenen etkin maddenin toksisitesindeki azalma üzerinde durulurken, taşıyıcının kendisinin olası toksisitesi gözardı edilmektedir. Aslında, bu tip uygulamalarda, olası toksik kalıntıların yol açabileceği potansiyel lokal ve/veya sistemik toksik yanıt riski bulunmaktadır. Jong ve diğ. (208) nanopartikül toksisitesine ilişkin dört olası mekanizma bildirmektedirler ki bu mekanizmalar, kimyasal ve parçalanma ürünlerine ilişkin toksisiteler ile bu nanopartiküllerin endositozuna ilişkin olan ve membran dağılma/çözünmesi sonucu olası toksisite olarak sıralanabilir.

Çalışmalarımızda, kamptotesinin amfifilik siklodekstrin nanopartikülleri, daha düşük sitotoksikite göstermeleri açısından, polimerik nanopartiküllere göre daha üstün bulunmuştur. Amfifilik siklodekstrinler ile nanopartiküller hazırlanırken sürfaktan kullanılması gerekmemesi nedeniyle, sürfaktanın neden olabileceği toksisitenin ve nanopartiküllerin kompleman aktivasyonunun önemli bir ölçüde engellenebileceği düşünülmektedir.

### **5.6.7. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Etkinlik Testi**

Hazırlanan nanopartiküllerin ve kamptotesinin DMSO içindeki çözeltisinin MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivite tayinleri Bölüm 3.1.9.7'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Kamptotesinin DMSO içindeki çözeltisi ile tedavisi sonrası 1:128 dilüsyonda hücre canlılığı % 65 iken; 6-O-Capro- $\beta$ CD için % 56,  $\beta$ -CDC6 için % 61, PLGA için % 81, PCL için % 68 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize, kamptotesinin nanopartiküler sistemdeki aktivitesinin çözelti formu ile eşit derecede ve hatta daha etkili olduğunu göstermektedir.

Bulunan veriler bize, kamptotesinin etkisinin, amfifilik siklodekstrinlere, özellikle de 6-O-Capro- $\beta$ -CD'e enkapsüle edilmesiyle daha fazla olabileceğini düşündürmektedir. Örneklerin MCF-7 hücreleri ile inkübasyon süresi, etkin maddenin salım ortamına geçmesi için yeterli bulunmuştur. Deneysel çalışmalar da,

amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerinin, PLGA ve PCL nanopartiküllerine kıyasla daha yüksek antikanser etkinlik sağladığını göstermiştir. Bu durum, amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerine yüklenen kamptotesin miktarının, polimerik nanopartiküllere yüklenen miktardan önemli ölçüde yüksek olması ile açıklanabilir. Nanopartiküllerde görülen antikanser aktivitenin, taşıyıcı sistemden kaynaklanmadığı, etkin madde içermeyen nanopartiküllerin incelenmesi ile gösterilmiş ve etkin madde içermeyen nanopartiküllerin, L929 hücreleri üzerinde 1/128 dilüsyonda toksik olmadığı anlaşılmıştır.

#### **5.6.8. Oluşturulan Tümörün Nanopartikül Süspansiyonu ile Tedavi Edilmesi**

Kanser tedavisinde pek çok antikanser ilaç, ciddi yan etkilere ve kemoterapide sorunlara yol açmaktadır, (17, 209) bunlar arasında en önemlilerinden birisi antikanser ilaçların çoğunda görülen suda çözünürlük sorunudur (210). Kamptotesinin biyoyeçimli çözücülerin çoğunda çözünürlüğünün olmaması, bu ilacın oral, intravenöz veya intramüsküler gibi konvansiyonel yollarla vücuda uygulanmasında sorunlara yol açmaktadır (153, 162). Bu nedenle, antikanser ilaçların çoğu intravenöz uygulama için yardımcı çözücülerle formüle edilmek zorundadır ve maalesef bu çözücülerin de çok ciddi toksisite sorunlarının bulunduğu bilinmektedir. Buna ilaveten, kanser tedavisinde kullanılan etkin maddelerin çoğu, dar terapötik aralık ve çözünürlük problemlerine bağlı olarak farmakokinetik değişkenlik göstermektedir. Bu da, her birey için uygulanan dozun normalize edilmesini gerektirmektedir. Yine, antikanser ilaçların geniş dağılma hacmi olması vücutta tümör hücrelerinin yanısıra normal hücrelere de etki ederek, sağlıklı hücrelere karşı sitotoksik etki göstermelerine neden olmaktadır. Ayrıca, kanser hücrelerinin fizyolojik bariyerlere ve hücrel mekanizmalara bağlı olarak farklı ilaç rezistansı geliştirme özelliklerinin bulunması kemoterapinin etkinliğini büyük ölçüde azaltmaktadır (147).

Literatürde yapılan in vivo deneyde (194) kamptotesinin geniş bir aralıkta (örn. akciğer, mide, yumurtalık, meme, pankreas kanserleri) hayvan ve insan tümörlerinin büyümesini durdurma özelliğine sahip olduğu ve L1210 lösemi

hücreleri ile muamele edilmiş farelerin yaşam sürelerini uzatmada çok etkin olduğu gösterilmiştir.

Tezimiz kapsamında, *in vivo* çalışmalarda, kan beyin engelinin sistemik uygulanan ilaçların taşınmasını engellemesi nedeniyle, stereotaksi yöntemi uygulanmıştır. Bu teknik, 1994 yılında kan beyin engelini aşmak ve lokal uygulama ile terapötik ajanın dağılımını artırmak amacıyla beyin tümörlerinin tedavisinde umut vaat edici bir teknik olarak önerilmiştir (147). Bu teknikte, nanopartikül süspansiyonu Hamilton® şırınga ile infüzyon pompasına yerleştirilmekte ve otomatik olarak ayarlanan pompa sayesinde iki saat boyunca pozitif basınç altında beyne sürekli nanopartikül süspansiyonu injeksiyonu gerçekleştirilmektedir. Deneylelerimizde bu yöntem ile, nanopartikül süspansiyonu, sıçanların kafatasında oluşturulan küçük bir delik sayesinde intrakranial olarak uygulanmış, standart olarak 60 µL nanopartikül süspansiyonu ile tedavi rejimi gerçekleştirilmiştir (211). Nanopartikül formülasyonları eşit hacimde uygulandığından her bir nanopartikül süspansiyonunda farklı konsantrasyonlarda kamptotesin uygulanmış, bu durum, uygulanan formülasyonların etkinliğinin değerlendirilmesine olanak vermiştir.

9L hücrelerinin uygulanması ile Fischer 344 sıçanlarında % 100 tümör oluşumu sağlanmış, oluşturulan tümörler magnetik rezonans tekniği ile görüntülenmiştir. Tedavi edilmeyen grupların yaşam süresi tümör oluşturulmasından sonra 20-30 gün olarak belirlenmiştir. β-CDC6, PLGA ve PCL nanopartikülleriyle tedavide ortalama yaşam süresi 26 günü geçmezken, 6-O-Capro-βCD ve yüksek konsantrasyondaki nanopartikül süspansiyonu ile sıçanlar 40 günden daha uzun süre yaşatılabilmektedir. Sonuçların, 6-O-Capro-βCD nanopartiküllerine yüklenen kamptotesin miktarının, diğer nanopartiküllere yüklenen miktardan önemli ölçüde yüksek olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen bulgular ışığında:

- Bu tez çalışmasında, günümüzün en önemli hastalıklarından ve önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan kanserin tedavisi için yeni ve etkili bir etkin madde olan kamptotesin ile nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmeye çalışılmıştır.
- Kamptotesinin siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksleri hazırlanarak etkin maddeye ilişkin çözünürlük ve stabilite sorunları büyük ölçüde ortadan kaldırılabilmektedir.
- Hazırlanan siklodekstrin nanopartikülleri ile kamptotesinin fizyolojik şartlardaki hidrolizi önlenmiştir.
- Siklodekstrin nanopartiküllerinin sahip olduğu partikül boyutları nedeni ile etkin, güvenli, enjekte edilebilir ve dayanıklı kamptotesin formülasyonları hazırlanabilmiş, bu yaklaşım ile klinik açıdan çok önemli olan bu hidrofobik etkin maddenin taşınmasında yeni bir yaklaşım sunulmuştur.
- Yüksek yükleme tekniği ile hazırlanmış amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanopartiküllerinin polimerik nanopartiküllere oranla daha yüksek oranda etkin madde yüklediği; ilaç yüklemesi üzerine etki eden önemli faktörlerden birisinin de yükleme tekniği olduğu gösterilmiştir.
- Hazırlanan bütün formülasyonlar ile etkin madde salımının önemli ölçüde geciktirildiği kontrollü salım sağlayan dozaj şekilleri hazırlanmıştır.
- Amfifilik siklodekstrinlerin modifikasyon bölgelerinin oluşturduğu sterik engelden dolayı amfifilik siklodekstrinlerden etkin madde salımının polimerik nanopartiküllere göre daha uzun sürede tamamlandığı gösterilmiştir.
- L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksitesite çalışmalarına göre, nanopartikül formülasyonlarının sitotoksitesitesinin taşıyıcı sistemden değil, etkin maddeden kaynaklandığı gösterilmiştir.

- İlaç yüklü nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitelerinin değerlendirilmesi sonucu, kamptotesinin amfifilik siklodekstrinlere enkapsüle edilmesi ile daha yüksek etkinlik sağlandığı gösterilmiştir.
- Stereotaksi yöntemi kullanılarak 9L hücreleri ile beyin glioması oluşturulduğu MR görüntüleriyle gösterilmiştir.
- İn vivo çalışmalarda 6-O-Capro- $\beta$ CD ve konsantre 6-O-Capro- $\beta$ CD nanopartikül formülasyonlarının sıçanlarda oluşturulan beyin gliomasının tedavisinde belli ölçüde başarı sağlayarak sıçanların yaşam sürelerini uzatabildiği gösterilmiştir.
- Bu sonuçlar doğrultusunda, kamptotesin yüklü siklodekstrin nanopartikülleri ile kanser tedavisi için umut vaat edici bir taşıyıcı sistem hazırlanabildiği düşünülmektedir.
- **Gelecekte,** amfifilik  $\beta$ -siklodekstrin nanopartiküllerin oral uygulamasına yönelik çalışmalar planlanabilir ve amfifilik  $\beta$ -siklodekstrinlerin oral biyoyararlanımı düşük antikanser ilaçlar üzerindeki olası etkileri incelenebilir. Ayrıca, siklodekstrinlerle hazırlanan inklüzyon kompleksleri sayesinde etkin maddenin sudaki çözünürlüğünün iyileştirilmesine bağlı olarak düşük oral biyoyararlanımları düzeltici yönde çalışmalar gerçekleştirilebilir.
- Siklodekstrinler üzerinde yapılabilecek modifikasyonlar ile kanda uzun süre dolaşımda kalabilecek ve/veya tümöre hedeflendirilmiş nanopartiküller hazırlanabilir ve kanserli dokulara daha etkin ve seçici ilaç taşınması gerçekleştirilebilir.

**KAYNAKLAR**

1. Langer, R. (2000). Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research*, 33, 94-101.
2. Mohanraj, V.J., Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561-573.
3. Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, P., Jain, N.K. (2002). Pegnology: a review of PEG-ylated systems. *Pharmazie*, 57, 5-29.
4. Kommareddy, S., Tiwari, S.B., Amiji, M.M. (2005). Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 4, 615-25.
5. Lee, M., Kim, S.W. (2005). Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research*, 22, 1-10.
6. Li, S., Wang, A., Jiang, W., Guan, Z. (2008). Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-Fluorouracil loaded Nanoparticles. *BMC Cancer*, 8, 103-111.
7. Mu, L., Feng, S.S. (2003). A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol(R)): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release*, 86, 33-48.
8. Kreuter, J. (1994). Nanoparticles. J. Kreuter (Ed.). *Colloidal drug delivery systems* (219-342). Marcel Dekker: New York.
9. Kumar, M.N.V.R. (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 234-258.
10. Legrand, P., Barratt, G., Mosqueira, V., Fessi, H., Devissaguet, J.P. (1999). Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review, *S.T.P. Pharma Sciences*, 9, 411-418.
11. Hans, M.L., Lowman, A.M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 319–327.

12. Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., Amidon, G.L. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14, 1568-1573.
13. De Jong, W.H., Borm, P.J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133-149.
14. Panyam, J., Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 329-347.
15. Al Khouri, N., Roblot-Treupel, L., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F. (1986). Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 28, 125-32.
16. Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1-20.
17. Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 631-651.
18. Kreuter, J. (2004). Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4, 484-8.
19. Govender, T., Riley, T., Ehtezazi, T., Garnett, M.C., Stolnik, S., Illum, L., Davis, S.S. (2000). Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 199, 95-110.
20. Chen, Y., Mohanraj, V.J., Parkin, J.E. (2003). Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an antiangiogenesis peptide. *Letters in Peptide Science*, 10, 621-627.
21. Panyam, J., Williams, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D., Labhasetwar, V. (2004). Solid-state solubility influences encapsulation and release of

- hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 1804-14.
22. Costigan, S. (2006). The toxicology of nanoparticles used in health care products. [http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=SS\\_GET\\_PAGE&nodId=996](http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=SS_GET_PAGE&nodId=996).
  23. Chakravarthi, S.S., Robinson, D.H. (2008). Biodegradable Nanoparticles. S.C. Gad (Ed). *Pharmaceutical manufacturing handbook* (s. 535-564). John Wiley&Sons Inc.: New Jersey.
  24. Vauthier, C., Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticle. *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1025-58.
  25. Şengel-Türk, C.T., Hasçıçek, C., Gönül, N. (2007). Nanoparticulate drug delivery systems for targeting the drugs to the brain. *Journal of Neurological Sciences*, 24(3), 254-263.
  26. Peracchia, M., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A., Lotan, N., Langer, R. (1997). PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *Journal of Controlled Release*, 46, 223–231.
  27. Chen, Y., McCulloch, R.K., Gray, B.N. (1994). Synthesis of albumin-dextran sulfate microspheres possessing favourable loading and release characteristics for the anti-cancer drug doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 31, 49-54.
  28. Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C. (2002). Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19, 99-134.
  29. Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 53, 283-318.

30. Storm, G., Belliot, S., Daemen, T., Lasic, D. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17, 31-48.
31. Torchilin, V., Trubetskoy, V. (1995). Which polymer can make nanoparticulate drug carriers long circulating? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 141-155.
32. Giordano, G.G., Refojo, M.F., Arroyo, M.H. (1993). Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34(9), 2743-2751.
33. Tunçay, M., Çalış, S. (1999). İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyoparçalanabilir sentetik ve doğal polimerler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 109-123.
34. Yenice, İ. Ortopedide kullanılan biyoparçalanır polimerler ile hazırlanan teikoplanin içeren mikropartiküler sistemli implantların formülasyonu ve in vitro - in vivo değerlendirilmesi üzerine çalışmalar, Bilim uzmanlığı tezi, H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
35. Eroğlu, H. Mikropartiküler sistemlerin formülasyonu ve beyine implantasyonu üzerinde çalışmalar, Bilim uzmanlığı tezi, H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2000.
36. Bozdağ Pehlivan, S. Beyin tümörlerinin tedavisine yönelik mitoksantron içeren mikropartiküler sistemlerin tasarımı ve değerlendirilmesi, Doktora tezi, H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003.
37. Jalil, R., Nixon, J.R. (1990). Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation*, 7(3), 297-325.
38. Okada, H., Toguchi, H. (1995). Biodegradable microspheres in drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 12(1), 1-99.
39. Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y. (1999). Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified

- spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, 187, 143-52.
40. Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 25(4), 471-476.
  41. Cho, C.S., Cho, K.Y., Park, I.K., Kim, S.H., Sasagawa, T., Uchiyama, M., Akaike, T. (2001). Receptor mediated delivery of all trans retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lacticacid) nanoparticles coated with galactose carrying polystyrene. *Journal of Controlled Release*, 77, 7-15.
  42. Erden, N., Çelebi, N. (1996). Factors influencing release of salbutamol sulphate from poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 137:57-66.
  43. Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan A. (2004). Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 1–23.
  44. Marchal-Heussler, L., Sirbat, D., Hoffman, M., Maincent, P. (1993). Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules in carteolol ophthalmic delivery, *Pharmaceutical Research*, 10(3), 386-390.
  45. Park, E.K., Lee, S.B., Lee, Y.M. (2005). Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs, *Biomaterials*, 26(9), 1053-1061.
  46. Cade, D., Ramus, E., Rinaudo, M., Auzely-Velty, R., Delair, T., Hamaide, T. (2004). Tailoring of bioresorbable polymers for elaboration of sugar-functionalized nanoparticles, *Biomacromolecules*, 5(3), 922-927.
  47. Kaş, H.S. (2002). İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. A. Gürsoy (Ed). *Kontrollü Salım Sistemleri* (s. 82-88). Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti.: İstanbul.

48. Constantino, L., Gandolfi, F., Tosi, G., Rivasi, F., Vandelli, M.A., Forni, F. (2005). Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 108, 84-96.
49. Schroeder, U., Sabel, B.A., Schroeder, H. (1999). Diffusion enhancement of drugs by loaded nanoparticles in vitro. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological*, 23, 941-949.
50. Schroeder, U., Schroeder, H., Sabel, B.A. (2000). Body distribution of 3H-labelled dalargin bound to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles after I.V. injections to mice. *Life Sciences*, 66, 495-502.
51. Friese, A., Seiller, E., Quack, G., Lorenz, B., Kreuter, J. (2000). Increase of the duration of the anticonvulsive activity of a novel NMDA receptor antagonist using poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles as a parenteral controlled release system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, 103-109.
52. Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21, 1428-1439.
53. Tosi, G., Rivasi, F., Gandolfi, F., Constantino, L., Vandelli, M.A., Forni, F. (2005). Conjugated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for the preparation of in vivo detectable nanoparticles. *Biomaterials*, 26, 4189-4195.
54. Löbenberg, R., Araujo, L., Kreuter, J. (1997). Body distribution of azidothymidine bound to nanoparticles after oral administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44, 127-132.
55. Wang, J.X., Sun, X., Zhang, Z.R. (2002). Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54, 285-290.
56. Kreuter, J. (1983). Evaluation of nanoparticles as drug delivery systems. I: Preparation methods. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 58, 196-209.

57. Calvo, P., Gouritin, B., Brigger, I., Lasmezas, C., Deslys, J.P., Williams, A., Andreux, J.P., Dormont, D., Couvreur, P. (2001). PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 111, 151-155.
58. Yang, Z. Yang, M., Peng, J. (2008). Evaluation of arsenic trioxide-loaded albumin nanoparticles as carriers: preparation and antitumor efficacy, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(8), 834-839.
59. Couvreur, P., Grislain, L., Lenaerts, V., Brasseur, F., Guiot, P., Biernacki, A. (1986). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug carrier for antitumour agents. P. Guiot, P. Couvreur (Ed.) *Polymeric nanoparticles and microspheres* (s.27-94). CRS Press: Boca Raton.
60. Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C. Vila-Jato, J. L., Alonso, M.J. (1999). Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 16(10), 1576-1581.
61. Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, *Science*, 263(5153), 1600-1603.
62. Bozkır, A., Saka, O.M. (2005). Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies, *Il Farmaco*, 60(10), 840-846.
63. Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research*, 14, 1431-1436.
64. Alonso, M. (1996). Nanoparticulate drug carrier technology. S. Cohen, H. Bernstein (Ed). *Microparticulate systems for the delivery of protein and vaccines* (203-241). Marcel Dekker: New York.
65. Li, F., Wang, L., Jin, X.M., Yan, C.H., Jiang, S., Shen, X.M. (2009). The immunologic effect of TGF-beta1 chitosan nanoparticle plasmids on ovalbumin-induced allergic BALB/c mice. *Immunobiology*, 214, 87-99.

66. Ishihara, T., Kubota, T., Choi, T., Higaki, M. (2009). Treatment of experimental arthritis with stealth-type polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329, 412-417.
67. Carino, G.P., Jacob, J.S., Mathiowitz, E. (2000). Nanosphere based oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, 65, 261-269.
68. Abraxane. Erişim: 01.06.2009, Ağ Sitesi: [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06n0107/06n-0107-ts00015-Desai\\_files/frame.htm#slide0296.htm](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06n0107/06n-0107-ts00015-Desai_files/frame.htm#slide0296.htm)
69. Alkhouri N., Fessi, H., Roblot-Treupel, L., Devissaguet, J. P., Puisieux, F. (1986). An original procedure for preparing nanocapsules of polyalkylcyanoacrylates for interfacial polymerization. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 61, 274-281.
70. Memişoğlu-Bilensoy, E., Şen, M., Hıncal, A.A. (2006). Effect of drug physicochemical properties on in vitro characteristics of amphiphilic cyclodextrin nanospheres and nanocapsules. *Journal of Microencapsulation*, 23, 59-68.
71. Chawla, J.S., Amiji, M.M. (2004). Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen. *International Journal of Pharmaceutics*, 249, 127-138.
72. Couvreur, P., Couarraze, G., Devissaguet, J. P., Puisieux, F. (1996). Nanoparticles: preparation and characterization. S. Benita (Ed). *Microencapsulation Methods and Industrial Applications* (s.183-211). Taylor & Francis: Newyork.
73. I want to measure Particle Size. Erişim: 01.06.2009, Ağ Sitesi: [http://www.malvern.com/LabEng/products/iwtm/particle\\_size.htm](http://www.malvern.com/LabEng/products/iwtm/particle_size.htm)
74. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammouy, N., Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, R1-R4.

75. Fessi, H., Devissaguet J. P., Puisieux F., Thies C. (1992). Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles, *U.S. Patent No.5,118,528* .
76. Bertholon, I., Ponchel, G., Labarre, D., Couvreur, P., Vauthier, C. (2006). Bioadhesive properties of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysaccharide. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 3102-3109.
77. RaviKumar, M.N.V., Mohapatrai, S.S., Kong, X., Jena, P.K., Bakowsky, U., Lehrd, C.M. (2004). Cationic Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles as Efficient in vivo Gene Transfection Agents, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4(8), 990-994.
78. Jarvinen, K., Pulkkinen, M., Hirvonen, J., Hirsjarvi, S., Peltonen, P. (2008). Preparation and characterization of polymeric nanoparticles and microparticles for pharmaceutical application. M.N.V.R. Kumar (Ed). *Handbok of particulate drug delivery* (s.18-34). American scientific publishers: California.
79. Villiers, M.A. (1891) Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus Acad. Sci.* 112, 536-538.
80. Friedman, R. (1991). Cyclodextrin containing polymers. In Duchene, D., Ed., *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*, Paris, Editions de Santé, 157-178.
81. Endo, T., Nagase, H., Ueda, H., Shigihara, A., Kobayashi, S., Nagai T. (1998). Isolation, purification and characterization of cyclomaltooctadecaose, cyclomaltononadecaose, cyclomaltoeicosaose and cyclomaltoheicosaose. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo), 46, 1840-1843.
82. Miyazawa, H., Ueda, H., Nagase, T., Endo, T., Kobayashi, S., Nagai, T. (1995). Physicochemical properties and inclusion complex formation of  $\delta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 153-162.
83. Brewster, M.E., Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645–666.

84. Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, 98 (5), 1743.
85. Rajewski, R.A., Stella, V.J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1142-1168.
86. Badr-Eldin, S.M., Seham A. Elkheshen, S.A., Ghorab, M.M. (2008). Inclusion complexes of tadalafil with natural and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrins. I: Preparation and in-vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 819–827.
87. Soner, C., Maa, Y.F., Lee, G. (2002). Spray-freeze-drying for protein powder preparation: particle characterization and a case study with trypsinogen stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 2122-2139.
88. Loftsson, T., Brewster, M. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1017-1025.
89. Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T. (1998). Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Reviews*, 98, 2045-2076.
90. Loftsson, T., Duchene, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329, 1–11.
91. Bilensoy, E., Hincal, A. A. (2008). Cyclodextrin based nanomaterials. S.C. Gad (Ed). *Pharmaceutical manufacturing handbook* (s. 1225-1247). John Wiley&Sons Inc.: New Jersey.
92. Strickley, R.G. (2004). Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical Research*, 21, 201-230.
93. Rekharsky, M.V., Inoue, Y. (1998). Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 1875-1917.
94. Hincal, A.A., Memisoglu-Bilensoy, E., Bochot, A., Duchene, D., (2003).  $\beta$ -cyclodextrines amphiphiles: evaluation de nouveaux excipients pour la

preparation de nanoparticules destinees a l'administration par voie parenterale ou topique. *Bulletin Technology Gattefosse*, 96(2), 35-47.

95. Challa, R., Alka A., Javed, A., Khar, R.K. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech.*, 6, E329-E357.
96. Thompson D.O. (1997). Cyclodextrins—enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 14, 1-104.
97. Albers E., Müller, B. W., Cyclodextrin derivates in pharmaceuticals, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 12(4), 311-337 (1995).
98. Hedges. A. R. (1998). Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 2035–2044.
99. Szejtli, J.(2000). What's new in cyclodextrin drug delivery? *Proceedings of Controlled Release Society Workshop, Paris*, Article #14.
100. Davis, M.E., Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 1023-1035.
101. Larsen, K.L. (2002). Large cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 43, 1–13.
102. Higuchi, T., Connors, K.A. (1965). Phase-solubility techniques. *Advanced Analytical Chemistry Instrument*, 4, 212-217.
103. Robert, P.Y., Leconte, V., Olive, R., Javerliat, M., Adenis, J.P. (2001). Collyre a la cyclosporine a: fabrication, toxicite, pharmacocinetique et indications en l'an 2000, *Journal of French Ophtalmology*, 24, 527-535.
104. Wouessidjewe, D., Skiba, M., Leroy-Lechat, F., Lemos-Senna, E., Puisieux F., Duchene D. (1996). A new concept in drug delivery based on skirt-shaped cyclodextrin aggregates: Present state and future prospects, *S.T.P. Pharma Science*, 6, 21-28.
105. Ueda, H., Ou, D., Endo, T., Nagase, H., Tomono, K., Nagai, T. (1998). Evaluation of a sulfobutyl ether beta-cyclodextrin as a solubilizing/stabilizing

- agent for several drugs. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 24, 863-867.
106. Skiba, M., Duchêne, D., Puisieux, F., Wouessidjewe, D. (1996). Development of a new colloidal drug carrier from chemically-modified cyclodextrins: nanospheres and influence of physicochemical and technological factors on particle size. *International Journal of Pharmaceutics*, 129, 113-121.
  107. Duchene, D., Wouessidjewe, D., Ponchel, G. (1999). Cyclodextrins and carrier systems, *Journal of Controlled Release*, 62, 263-268.
  108. Vural, I., Memişoğlu-Bilensoy, E., Renoir, J.M., Bochot, A., Duchene, D., Hincal, A.A. (2005). Transcription efficiency of tamoxifen citrate loaded  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 15(5), 339-342.
  109. Fessi, H., Devissaguet, J.P., Thies, C. (1998). Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanospheres. *US Patent*, 5,118,528.
  110. Memisoglu-Bilensoy, E., Vural, I., Bochot, A., Renoir, J.M., Duchene, D., Hincal, A.A. (2005). Tamoxifen citrate loaded amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles: In vitro characterization and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release*, 104, 489-496.
  111. Memisoglu-Bilensoy, E., Dogan, A.L., Hincal, A.A. (2006). Cytotoxic evaluation of injectable cyclodextrin nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 585-589.
  112. Loftsson, T., Hreinsdottir, D., Mason, M. (2005). Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 302, 18-28.
  113. Debouzy, J.C., Fauvelle, F., Crouzy, S., Girault, L., Chapron, Y., Göschl, M., Gadelle, A. (1997). Mechanism of  $\alpha$ -cyclodextrin induced hemolysis 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline-phospholipids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(1), 59-66.

114. Müller, B. W., Brauns, U. (1986). Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Influence of average degree of substitution on complexing ability and surface activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 571-572.
115. Yoshida, A., Yamamoto, M., Irie, T., Hirayama, T., Uekama, K. (1989). Some pharmaceutical properties of 3-hydroxypropyl/ and 2,3-dihydroxypropyl-  $\beta$ -cyclodextrins and their solubilizing and stabilizing ability. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1059-1063.
116. Müller, B. W. (2000). Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in drug formulation. *What's new in cyclodextrin drug delivery? Proceedings of Controlled Release Society Workshop, Paris*, Article #3.
117. Memisoglu-Bilensoy, E., Bochot, A., Trichard, L., Duchene, D., Hincal, A.A. (2005). Amphiphilic cyclodextrins and microencapsulation. S. Benita (Ed). *Microencapsulation* (s. 269-295). Taylor and Francis: New York.
118. Bilensoy, E., Gürkaynak, O., Ertan, M., Şen, M., Hincal, A.A. (2008). Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 1519-1529.
119. Memisoglu, E., Bochot, A., Ozalp, M., Sen, M., Duchene, D., Hincal, A.A. (2003). Direct formation of nanospheres from amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *Pharmaceutical Research*, 20, 117-125.
120. Memisoglu, E., Bochot, A., Sen, M., Duchene, D., Hincal, A.A. (2003). Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complexes with amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 251, 143-153.
121. Memisoglu, E., Bochot, A., Sen, M., Charon, D., Duchene, D., Hincal, A.A. (2002). Amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrins modified on the primary face: synthesis, characterization and evaluation of their potential as novel excipients in the preparation of nanocapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 1214-1224.
122. Yu, S.C., Bochot, A., Bas, G.L., Chéron, M., Mahuteau, J., Grossiord, J.L., Seiller, M., Duchêne, D. (2003). Effect of camphor/cyclodextrin

- complexation on the stability of O/W/O multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 261, 1-8.
123. Bilensoy, E., Dogan, L., Sen, M., Hincal, A.A. (2007). Complexation behavior of antiestrogen drug tamoxifen citrate with natural and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 651–655.
124. Skiba, M., Wouessidjewe D., Puisieux, F., Duchêne, D., Gulik, A. (1996). Characterization of amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin nanospheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 142, 121-124.
125. Stevens, D.A. (1999). Itraconazole in cyclodextrin solution. *Pharmacotherapy*, 9, 603-611.
126. Blanchard, J., Ugwu, S.O., Bhardwaj, R., Dorr, T. (2000). Anhydrous carbopol polymer gels for the topical delivery of oxygen/water sensitive compounds, *Pharmaceutical Development and Technology*, 7, 249-255.
127. Zuo, Z., Kwon, G., Stevenson, B., Diakur, J., Wieb, L.I. (2000). Flutamide-Hydroxy proyl- $\beta$ -cyclodextrin complex: formulation, physical characterization and absorption studies using the Caco-2 in vitro model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 220-227.
128. Yoo, S.D., Yoon, B.M., Lee, H.S., Lee, K.C. (1999). Increased bioavailability of clomipramine after sublingual administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 1119-1121.
129. Merkus, F.W., Verhoef, J.C. Martin, E. (1999). Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 41-57.
130. Loftsson, T., Gudmundsdottir, H., Sigurjonsdottir, J.F. (2001). Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: formulation of midazolam nasal spray, *International Journal of Pharmaceutics*, 212, 29-40.
131. Zhang, Y., Jiang, X.G., Yao, J. (2001). Nasal absorption enhancement of insulin by sodium deoxycholate in combination with cyclodextrins. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22, 1051-1056
132. Uekama, K., Kondo, T., Nakamura, K. (1995). Modification of rectal absorption of morphine from hollow-type suppositories with a combination of

- alpha-cyclodextrin and viscosity-enhancing polysaccharide, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84,15-20.
133. Kowari, K., Hirose, I., Kurai, H., Utoguchi, N., Fujii, M., Watanabe, Y. (2002). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of human chorionic gonadotropin (hCG) after rectal administration of hollow-type suppositories containing hCG, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25,678-681.
  134. Horiuchi, Y., Hirayama, F., Uekama, K. (1990). Slow-release characteristics of diltiazem from ethylated  $\beta$ -cyclodextrin complex. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79,128-132.
  135. Hirayama, F., Hirashima, N., Abe, K., Uekama, K., Ijitsu, T., Ueno, M. (1988). Utilization of diethyl-beta-cyclodextrin as a sustained-release carrier for isosorbide dinitrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 233-236.
  136. Minami, K., Hirayama, F., Uekama, K. (1998). Colon-specific drug delivery based on a cyclodextrin prodrug: release behavior of biphenylacetic acid from its cyclodextrin conjugates in rat intestinal tracts after oral administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 715-720.
  137. Wu, W.M., Wu, J., Bodor, N. (2002). Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the solubility, stability, and pharmacological activity of the chemical delivery system of TRH analogs. *Pharmazie*, 57, 130-134.
  138. Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O. (2004). Nanoparticles and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659.
  139. Haley, B., Frenkel, E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic oncology: seminars and original investigations*, 26, 57-64.
  140. Chiannikulchai, N., Driouich, Z., Benoit, J.P., Parodi, A.L., Couvreur, P. (1989). Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastases, *Selective Cancer Therapeutics*, 5, 1-11.
  141. Chiannikulchai, N., Ammoury, N., Caillou, B., Devissaguet, J.P., Couvreur, P. (1990). Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 26, 122-126.

142. Adams, J.D., Flora, K., Goldspiel, B.R., Wilson, J.W., Finley, R. (1993). Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns, *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 15, 141-147.
143. Leroux, J.C., Vergas, A., Doelker, E., Gurny, R., Delie, F. (2006). The use of drug loaded nanoparticles in cancer chemotherapy. S. Benita (Ed). *Microencapsulation methods and industrial applications* (s. 625-671). Taylor&Francis: New York.
144. Dong, Y., Feng, S.S. (2005). Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26, 6068-6076.
145. Cohen, L.A. (1986). Dietary fat and mammary cancer. B.S. Reddy, L.A. Cohen (Ed). *Diet, nutrition and cancer: a critical evaluation*. (s.77-100). CRC Press: Boca Raton, FL.
146. Gralow, J., Ozols, R.F., Bajorin, D.F., Cheson, B.D., Sandler, H.M., Winer, E.P. (2008). Clinical cancer advances 2007: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening – a report from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 313–25.
147. Allard, E., Passirani, C., Benoit, J.P. (2009). Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. *Biomaterials*, 30, 2302–2318.
148. Hatefi, A., Amsden, B. (2002). Camptothecin delivery methods. *Pharmaceutical Research*, 19, 1389-1399.
149. Takimoto, C.H., Wright, J. Arbuck, S.G. (1998). Clinical applications of the camptothecins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 107-119.
150. Warner, D.L., Burke, T.G. (1997). Simple and versatile high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of the lactone and carboxylate forms of camptothecin anticancer drugs. *Journal of Chromatography B.*, 691, 161–171.
151. Adams, D.J., Dewhirst, M.W., Flowers, J.L., Gamcsik, M.P., Colvin, O.M., Manikumar, G., Wani, M.C., Wall, M.E. (2000). Camptothecin analogues

- with enhanced antitumor activity at acidic pH, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46, 263-272.
152. Caiolfa, V.R., Zamai, M., Fiorino, A., Frigerio, E., Pellizzoni, C., D'Argy R, Ghiglieri A., Castelli M.G., Farao, M., Pesenti E., Gigli, M., Angelucci, F., Suarato A. (2000). Polymer-bound camptothecin: initial biodistribution and antitumor activity studies, *Journal of Controlled Release*, 65, 105-119.
  153. Topcu, Z. (2001). DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 26, 405-416.
  154. Rothenberg, M.L. (1997). Topoisomerase I inhibitors: Review and update, *Annals of Oncology* 8, 837-855.
  155. Tong, W., Wang, L., D'Souza, M.J. (2003). Evaluation of PLGA microspheres as delivery system for antitumor agent-camptothecin. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 29, 745-756.
  156. Williams, J., Lansdown, R., Sweitzer, R., Romanowski, M., LaBell, R., Ramaswami, R., Unger, E. (2003). Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors. *Journal of Controlled Release*, 91, 167-172.
  157. Gelderblom, A.J.H., De Jonge, M.J.A., Sparreboom, A., Verweij, J. (1999). Oral topoisomerase 1 inhibitors in adult patients: present and future; *Investigational New Drugs*, 17, 401-415.
  158. Ertl, B., Platzer, P., Wirth, M., Gabor, F. (1999). Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin. *Journal of Controlled Release*, 61, 305-317.
  159. Vollmer-Haase, J., Young, P., Ringelstein, E.B. (1997). Efficacy of camptothecin in progressive multifocal leucoencephalopathy, *Lancet*, 349, 1366-1370.
  160. Proulx, M. E., Desormeaux, A., Marquis, J.F., Olivier, M., Bergeron, M.G. (2001). Treatment of visceral leishmaniasis with sterically stabilized liposomes containing camptothecin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2623-2627.

161. Koo, M., Rubinstein, I., Onyuksel H. (2005). Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: A novel nanomedicine. *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology And Medicine*, 1,77-84.
162. Hatefi, A., Knight, D., Amsden, B. (2004). A Biodegradable injectable thermoplastic for localized camptothecin delivery. *Journal of Pharmaceutical Science*, 93(5), 1195-1204.
163. Wall, M.E. (1998). Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Medicinal Research Reviews*, 18, 299-314.
164. Kehrer, D.F.S., Soepenber, O., Loos, W.J., Verweij, J., Sparreboom, A. (2001). Modulation of camptothecin analogs in the treatment of cancer: a review. *Anti-Cancer Drugs*, 12, 89-105.
165. Potmesil, M. (1994). Camptothecins: from bench research to hospital wards. *Cancer Research*, 54, 1431-1439.
166. Garcia-Carbonero, R., Supko, J.G. (2002). Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clinical Cancer Research*, 8, 641-661.
167. Opanasopit, P., Yokoyama, M., Watanabe, M., Kawano, K., Maitani, Y., Okana, T. (2004). Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting, *Pharmaceutical Research*, 21(11), 2001-2008.
168. Ezell, E.L., Smith, L.L. (1991). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR Spectra of Camptothecin and Derivatives. *Journal of Natural Products*, 54(6), 1645–1650.
169. Conover, C.D., Greenwald, R.B., Pendri, A., Gilbert, C.W., Shum, K.L. (1998). Camptothecin delivery systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 42, 407-414.
170. Shenderova, A., Burke, T.G., Schwendeman, S.P. (1999). The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins. *Pharmaceutical Research*, 16, 241-248.

171. Berrada, M., Serreqi, A., Dabbarh, F., Owusu, A., Gupta, A., Lehnert, S. (2005). A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy. *Biomaterials*, 26, 2115-2120.
172. Cortesi, R., Esposito, E., Maietti, A., Menegatti, E., Nastruzzi, C. (1997). Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 159, 95-103.
173. Kunii, R., Onishi, H., Machida, Y. (2007). Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 9-17.
174. Lalloo, A., Chao, P., Hu, P., Stein, S., Sinko, P.J. (2006). Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a novel in situ forming poly(ethylene glycol)-based hydrogel for the controlled delivery of the camptothecins. *Journal of Controlled Release*, 112, 333-342.
175. Tyner, K.M., Schiffman, S.R., Giannelis, E.P. (2004). Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin. *Journal of Controlled Release*, 95, 501-514.
176. Yang, S.C., Zhu, J.B. (2002). Preparation and characterization of camptothecin solid lipid nanoparticles. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 28, 265-274.
177. Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., Davis, S.S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57, 171-185.
178. Kunii, R., Onishi, H., Ueki, K., Koyama, K., Machida, Y. (2008). Particle characteristics and biodistribution of camptothecin-loaded PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles. *Drug Delivery*, 15, 3-10.
179. Min, K. H., Park, K., Kim, Y.S., Bae, S.M., Mun, S., Lee, S., Jo, H. G., Park, R.W., Kim, I.S., Jeong, S.Y., Kim, K., Kwon, I.C. (2008). Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance

- the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 127, 208–218.
180. Tung, W., Wang, L., D'Souza, M.J. (2003). Evaluation of PLGA microspheres as delivery system for antitumor agent-camptothecin. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 29(7), 745-256.
  181. Camptosar, Hycamtin. Erişim: 01.06.2009, Ağ Sitesi: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Speeches/ucm054769.htm>
  182. Jones, R. (1996). Human cell culture protocols. Human Press Inc., Totowa, New Jersey.
  183. Synder, E.Y., Deitcher, D.L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartweig, E.A., Cepko, C.L. (1992). Ultipotent cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*, 68, 33-51.
  184. Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Conel, C., Quon, D., Sim, G.K., Eftradiasis, A. (1978). The isolation of structural genes from libraires of eukaryotic DNA. *Cell*, 15, 687-701.
  185. Denizli, A. (1994). Collagen and fibronectin immobilization ob PHEMA microcarriers for hepatocyte attachment. *International Journal of Artificial Organs*, 12, 311-322.
  186. Mahter, J.P., Roberts, P.E. (1998). Introduction to Cell and Tissue Culture, Plenum Press, New York.
  187. Rosenfeld, M.A., Yoshimura, K., Trapnell, B.C., Yoneyama, K. (1992). In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 68, 143-155.
  188. Michler-Struke, A, Bottenstein, J. (1982). Proliferation of glialderive cells in defined media. *Journal of Neuroscience Research*, 7, 215-228.
  189. Doyle, A., Griffiths, J.B. (2000). Cells and tissue culture fo medical research. John Wiley&Sons Ltd, Chichester.
  190. Chen, C.H., Campbell, P.A., Newman, L.S. (1990). MTT colorimetric assay detects mitogen responses of spleen but not blood lymphocytes. *International Archives of Allergy & Applied Immunology*, 93, 249-255.

191. Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, 119, 203-210.
192. Campling, B.G., Pym, J., Galbraith, P.R., Cole, S.P.C. (1988). Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemia Research*, 12, 823-831.
193. Scott, D.O., Bindra, D.S., Stela, V.J. (1993). Plasma pharmacokinetics of the lactone and carboxylate forms of 20(S)-camptothecin in anesthetized rats, *Pharmaceutical Research*, 10(10), 1451-1457.
194. Wall, M.E., Wani, W. (1966). Plant antitumor agents I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloid leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*, *Journal of The American Chemical Society*, 88, 3888-3890.
195. Emerson, D.L. (2000). Liposomal delivery of camptothecins, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3, 205-209.
196. Koshkina, N.V., Gilbert, B.E. (1999). Distribution of camptothecin after delivery as a liposome aerosol or following intramuscular injection in mice, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 44, 187-192.
197. Lundberg, B.B. (1998). Biologically active camptothecin derivatives for incorporation into liposome bilayers and lipid emulsions, *Anticancer Drug Design*, 13, 453-461.
198. Kumar, V., Kang, J., Hohi, R.J. (2001). Improved dissolution and cytotoxicity of camptothecin incorporated into oxidized- cellulose microspheres by spray drying, *Pharmaceutical Development and Technology*, 6, 459-467.
199. Chourpa, I., Millot, J.M., Sockalingum, G.D., Riou, J.F., Manfait, M. (1998). Kinetics of lactone hydrolysis in antitumor drugs of camptothecin series as studied by fluorescence spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379(3), 353-66.
200. Kawashima, Y., Okumura, M., Takenaka, H. (1982). Spherical crystallization: direct spherical agglomeration of salicylic acid crystals during crystallization, *Science*, 216, 1127-1128.

201. Skiba, M., Puisieux, F., Duchene, D., Wouessidjewe D. (1995). Direct imaging of modified  $\beta$ -cyclodextrin nanospheres by photon scanning tunnelling and scanning force microscopy, *International Journal of Pharmaceutics*, 120, 1-11.
202. Hincal, A.A., Bilensoy, E. (2006). Formulation of poorly water soluble drugs with amphiphilic beta-cyclodextrins, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28 (Suppl 1), S8-S9.
203. Yoo, H.S., Choi, H.K., Park, T.G. (2001). Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(2), 194-201.
204. Jain, R.K. (2001). Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 149–168.
205. Ambruosi, A., Gelperina, S., Khalansky, A., Tanski, S., Theisen, A., Kreuter, J. (2006). Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model, *Journal of Microencapsulation*, 23(5), 582-592.
206. Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622-627.
207. Benita, S., Levy, M.Y. (1993). Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82, 1069–1079.
208. Jong, W.H.D., Borm, P.J.A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazard. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133-149.
209. Yokoyama M. (2005). Drug targeting with nano-sized carrier systems, *Journal of Artificial Organs*, 8, 77-84.
210. Çırpanlı, Y., Bilensoy, E., Doğan, A.L., Çalış, S. (2009). Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Baskıda).
211. Allard, E., Passirani, C., Garcion, E., Pigeon, P., Vessieres, A., Jaouen, G., Benoit, J.P. (2008). Lipid nanocapsules loaded with an organometallic

tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas, *Journal of Controlled Release*, 130, 146–153.

**ÖZGEÇMİŞ**

- Adı, Soyadı** : Yasemin Çırpanlı
- Pozisyonu ve İş Adresi** : Araştırma Görevlisi, Uzman Eczacı.  
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06100,  
Ankara.
- Doğum Tarihi, Yeri** : 22 Haziran 1977, Ankara
- Tabiyeti** : T.C.
- Telefon** : +90 312 305 12 41
- Faks** : +90 312 310 09 06
- EĞİTİM DURUMU** :
- 1995-1999 Lisans Derecesi (Pharm.)  
Hacettepe Üniversitesi,  
Eczacılık Fakültesi.
- 2003- Bilim Uzmanlığı Derecesi (M.Sc.)  
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.

**MESLEKİ ÜYELİKLER:**

- Farmasötik Bilimler Ankara Derneği (FABAD)

- Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)
- Hacettepe Eczacılık Teknolojisi Derneği (HETEK)
- Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği

#### **ÇALIŞMA ALANLARI:**

- Biyoparçalanır polimerler kullanılarak mikropartiküler sistemlerinin tasarlanması ve formülasyonu
- Siklodekstrin bazlı ilaç taşıyıcı sistemler
- Antikanser ilaçların nanopartiküler sistemlerle formülasyonu
- Nanopartiküler sistemler

#### **TEZ:**

#### **“Retinoik Asit İçeren Oftalmik Mikropartiküllerin Formülasyonu ve İn-Vitro Karakterizasyonu”**

Bilim Uzmanlığı (M.Sc.) Tezi, Eylül 2003, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara.

#### **ARAŞTIRMA MAKALELERİ**

1. **Çırpanlı, Y., Ünlü, N., Çalış, S., Hıncal, A.A.,** “All-Trans-Retinoic Acid Microspheres: Preparation and In-Vitro Characterization” **Eur. J. Pharm. Sci. (Suppl)**, 23(1), S53, PO-57, 2004.
2. **Çırpanlı, Y., Ünlü, N., Çalış, S., Hıncal, A.A.,** “Formulation and In-Vitro Characterization of Retinoic Acid Loaded Poly(Lactic-Co-GlycolicAcid) Microspheres” **J. Microencapsulation**, 22(8): 877–889, 2005.
3. Bilensoy, E., **Çırpanlı, Y., Şen, M., Doğan, A.L., Çalış, S.** “Thermosensitive Mucoadhesive Gel Formulation Loaded with 5-FU: Cyclodextrin Complex for

- HPV-Induced Cervical Cancer” **J. Inclus. Phenom. Macroc. Chem.**, 57(1-4), 363-370, 2007.
4. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Çalış, S., Hıncal, A.A., Stabilization of Camptothecin in PLGA Nanoparticles, **Eur. J. Pharm. Sci.**, **32 Supp1**, S18-19 (2007)
  5. Çakmak, A., Sarıbaş, Z., **Çırpanlı, Y.**, Çalış, S., Haşçelik, G., Yorgancı, K., Kaynaroğlu, V. Antibacterial Effects of Triclosan Coated Polypropylene Grafts on Graft Infection Model in Rats, **Surgical Infections**, 9(2), 2000, s.308.
  6. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Doğan, A.L., Çalış, S. “Comparative Evaluation of Polymeric and Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles For Effective Camptothecin Delivery” **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 73(1), 82-9, 2009.
  7. Çakmak, A., **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Yorgancı, K., Çalış, S., Sarıbaş, S., Kaynaroğlu, V. “Antibacterial Activity of Triclosan Chitosan Coated Graft on Hernia Graft Infection Model” **Int. J. Pharm.** (kabul edildi).
  8. Bilensoy, E., Moroy, P., **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, T., Çalış, S., Mollamahmutoglu, L. “A Double-Blind Placebo-Controlled Study of 5-Fluorouracil:Cyclodextrin Complex Loaded Thermosensitive Gel for The Treatment of HPV Induced Condyloma” **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.** (gönderildi).

## **SÖZLÜ SUNUM**

**Çırpanlı, Y.** “Exclusivity, Commercialization of Patent, Traps and Misconceptions”, **Patent Perspectives in Pharmaceutical Industry – Pre Course of 12<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium**, 11 Eylül 2004, İstanbul, Türkiye.

## BİLDİRİLER

- **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**

1. **Çırpanlı, Y., Ünlü, N., Çalış, S., Hıncal, A.A.**, “All-Trans-Retinoic Acid Loaded Ocular Microspheres: Preparation and In-Vitro Characterization” Proceedings 30<sup>th</sup> Annual Meeting&Exposition of the Controlled Release Society, 19-23 Temmuz 2003, Glasgow, İskoçya-İngiltere.
2. Ünlü, N., **Çırpanlı, Y.**, Çalış, S., Sargon, M., Hıncal, A.A., “Preparation and In-Vitro Characterization of PLGA (50:50) Microparticles Containing All-Trans-Retinoic Acid” 1<sup>st</sup> EUFEPS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation: New Challenges in Drug Delivery, 29 Eylül-1 Ekim 2003, Paris, Fransa.
3. **Çırpanlı, Y.**, Ünlü, N., Çalış, S., Hıncal, A.A., “All-Trans-Retinoic Acid Microspheres: Preparation and In-Vitro Characterization” EUFEPS 2004 New Safe Medicines Towards Mechanistic Prediction, 17-20 Ekim 2004, Brüksel, Belçika.
4. **Çırpanlı, Y.**, Aksungur, P., Ünlü, N., Çalış, S., Hıncal, A.A., “Stability Assessment of All-Trans-Retinoic Acid Microspheres” 15<sup>th</sup> International Symposium on Microencapsulation, 18-21 Eylül 2005, Parma, İtalya.
5. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E, Salih, B., Şen, M., Çalış, S., “Thermosensitive Mucoadhesive Gel Formulation Loaded With 5-FU:Cyclodextrin Complex For HPV-Induced Cervical Cancer” 13<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium, 14-17 Mayıs 2006, Torino, İtalya.
6. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E, Çalış, S., Şen, M., Hıncal, A.A. “Camptothecin Inclusion Complexes with Natural and Modified  $\beta$ -Cyclodextrins” 33<sup>rd</sup> Annual Meeting&Exposition of the Controlled Release Society, 22-26 Temmuz 2006, Viyana, Avusturya.

7. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Çalış, S., Şen, M., Hıncal, A.A. “Development of Camptothecin Loaded Nanoparticles from Amphiphilic  $\beta$ -Cyclodextrin Derivatives” Pharmaceutical Sciences World Congress, 22-25 Nisan 2007, Amsterdam, Hollanda.
8. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Çalış, S., Hıncal, A.A. “Stabilization of Camptothecin in PLGA Nanoparticles” The 2<sup>nd</sup> BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 13-15 Eylül 2007, Tallinn-Tartu, Estonya (**sözlü sunum**).
9. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Çalış, S. Formulation And In-Vitro Evaluation of Camptothecin Loaded Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Nanoparticles, 6<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 7-10 Nisan 2008, Barselona, İspanya.
10. Çakmak, A., Sarıbaş, Z., **Çırpanlı, Y.**, Çalış, S., Haşçelik, G., Yorgancı, K., Kaynaroğlu, V. Antibacterial Effects of Triclosan Coated Polypropylene Grafts on Graft Infection Model in Rats. 21<sup>st</sup> European Congress Surgical Infection Society–Europe, 1–3 Mayıs 2008, Antalya, Türkiye.
11. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Passirani, C., Çalış, S., Benoit, J.P. Evaluation of camptothecin loaded nanoparticles for malignant gliomas, Globalization of Pharmaceutical Education Network-GPEN 2008, 9-12 Eylül 2008, Leuven, Belçika.
12. **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, E., Çakmak, A., Çalış, S. Formulation and In Vitro In Vivo Evaluation of Triclosan Coated Grafts, 7<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biodelivery Systems, 18-20 Eylül 2008, Ljubljana, Slovenya.
13. **Çırpanlı, Y.**, Robineau, C., Çapan, Y., Çalış, S. Etodolac Loaded Poly (lactide-co-glycolide) Nanoparticles: Formulation and In Vitro Characterization, International Symposium on Drug Research and Development 2009, From Chemistry to Medicine & Educational Fair on

"GLP and Laboratory Safety: New Approaches", 04-07 Mayıs 2009, Ankara, Türkiye.

14. Choplin, J., Robineau, C., **Çırpanlı, Y.**, Çaban, S., Çalış, S., Çapan, Y. Non Steroidal Anti İnflammatory Drugs Loaded Poly (lactide-co-glycolide) and Chitosan Nanoparticles: Formulation And İn Vitro Characterization, 2<sup>nd</sup> PharmSciFair 2009-Premier European Platform for Advancing Pharmaceutical Sciences, 8-12 Haziran 2009, Nice, Fransa.
15. Bilensoy, E., Moroy, P., **Çırpanlı, Y.**, Bilensoy, T., Çalış, S., Mollamahmutoğlu, L. Placebo Controlled Clinical Trial Of Thermosensitive Gel Loaded with 5-FU:Cyclodextrin Complex for Treatment of HPV-Induced Genital Lesions. **The First European Cyclodextrin Conference**, 11-13 Ekim 2009, Danimarka (sunulacak).

- **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**

1. Bilensoy, E., **Çırpanlı, Y.**, Gürkaynak, O., Doğan, A.L., Antikanser İlaçların Biyoyararlanım Sorunlarının Siklodekstrinlerle Kompleksleşme Sonucu Çözülmesi, 17. Ulusal Kanser Kongresi, 19-23 Nisan 2007, Antalya, Türkiye.

**PROJELER :**

1. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Araştırmalarında Stabilite Değerlendirmeleri: Retinoik Asit İçeren Mikrokürelerin Formülasyonu ve Stabilite Çalışmaları, H.Ü. ARAŞTIRMA FONU Alt Yapı Projesi.
2. Kamptotesin İçeren Amfifilik Beta-Siklodekstrin Nanopartiküllerin Formülasyonu, İn Vitro Değerlendirilmesi ve Antikanser Etkinliği, TÜBİTAK Projesi, SBAG-HD-66, 2005-2006.
3. Oküler İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküllerin Tasarımı ve Değerlendirilmesi, TÜBİTAK-BAYG/BDP Yurt İçi-Yurt Dışı Bütünleştirilmiş Doktora Burs Programı, 2007.
4. Fitik Greft Enfeksiyon Modelinde Triklosan Kaplı Greftin Etkisi, H.Ü. ARAŞTIRMA FONU Projesi, 07D04101002, 2007.

**EK 1**

**YAYIN**

**European Journal of Pharmaceutics and  
Biopharmaceutics – 2009**

**EK 2****ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA  
SUNULAN BİLDİRİLER**